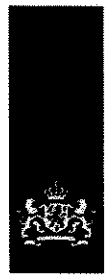


Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie
Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Onze referentie
W17-17

Uw referentie
[redacted]

Briefkenmerk

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

Datum 01 NOV 2018
Betreft Wob-besluit W17-17

Geachte [redacted]

In uw e-mail van 1 oktober 2017 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) om informatie verzocht met betrekking tot de projectvergunningen die de CCD in de maand september 2017 heeft afgegeven (uw kenmerk: [redacted]).

Dit verzoek is door de CCD behandeld onder het kenmerk W17-17. In deze brief vindt u een overzicht van de gevolgde procedure en het besluit op het verzoek. In de overwegingen vindt u een toelichting op de inhoudelijke afwegingen over de openbaarmaking.

1. Besluit

De CCD besluit om de door u gevraagde informatie gedeeltelijk te openbaren. De algemene overwegingen die de CCD maakt over weigeringsgronden die zijn ingeroepen door derde belanghebbenden staan onder de 'Overwegingen' in dit besluit. Onder 'Beoordeling per vergunning' leest u de specifieke overwegingen per vergunning.

2. Procedure

- De ontvangst van uw verzoek (met ons kenmerk W17-17) is op 2 oktober 2017 per brief (per e-mail verzonden) aan u bevestigd.
- Met de brief van 26 oktober 2017 (per e-mail aan u verzonden) heeft de CCD u laten weten dat de beslistermijn met vier weken is verdaagd.
- Vervolgens is met de brief van 22 november 2017 (op deze datum per e-mail aan u verzonden) aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort – gerekend vanaf 22 november 2017 – vanwege het vragen van zienswijzen aan derde belanghebbenden.

3. Wettelijk kader

Uw verzoek valt (deels) onder de reikwijdte van de Wob.

4. Inventarisatie documenten

Onder uw verzoek vallen 30 projectvergunningen. Het betreft de vergunningen met de nummers van de Niet Technische Samenvatting (hierna: NTS):

1. NTS2017775	11. NTS20171664	21. NTS20172744
2. NTS2017867	12. NTS20171666	22. NTS20172804
3. NTS2017869	13. NTS20171667	23. NTS20172885
4. NTS2017890	14. NTS20171765	24. NTS20172905
5. NTS2017903	15. NTS20171767	25. NTS20173084
6. NTS2017946	16. NTS20172125	26. NTS20173104
7. NTS20171124	17. NTS20172327	27. NTS20173105
8. NTS20171185	18. NTS20172348	28. NTS20173124
9. NTS20171287	19. NTS20172425	29. NTS20173165
10. NTS20171344	20. NTS20172726	30. NTS20173184

Per vergunning is een afzonderlijke inventarislijst opgesteld. Deze lijst bevat een tabel met een genummerde opsomming van alle aanwezige documenten.

5. Zienswijzen

Bij de openbaarmaking van de documenten zijn derde belanghebbenden betrokken, te weten de betreffende vergunninghouders en dierexperimentencommissies (hierna: DEC's). Zij zijn in de gelegenheid gesteld om over de eventuele openbaarmaking van de documenten een zienswijze te geven. De ingediende zienswijzen zijn betrokken bij de beoordeling van het verzoek tot openbaarmaking.

6. Reeds openbare documenten

Van iedere verleende vergunning wordt een NTS op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar. Per projectvergunning staat per inventarislijst aangegeven welk document de NTS betreft.

7. Overwegingen

Op grond van artikel 3, lid 5 van de Wob wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van hetgeen is bepaald in de artikelen 10 en 11 van de Wob. Hierna licht de CCD eerst in algemene zin toe welke kaders de Wob geeft voor openbaarmaking. Vervolgens wordt per weigeringsgrond, ingeroepen door derde belanghebbenden bij dit Wob-verzoek en/of bij eerdere Wob-verzoeken, ingegaan op de algemene overwegingen die de CCD maakt en wat dit betekent voor het al dan niet openbaar maken van (delen van) de betreffende vergunningen.

Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. De te verrichten belangenafweging betreft dan ook het algemene belang van openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

Evenmin kent de Wob een beperkte vorm van openbaarmaking. Dit betekent dat openbaarmaking van de gevraagde documenten uitsluitend aan u op grond van de Wob niet mogelijk is. Indien de CCD de betreffende documenten aan u verstrekt, dan moet zij deze ook aan anderen geven indien daarom verzocht wordt. In dat licht vinden de onderstaande belangenafwegingen dan ook plaats.

7.1. Misbruik van recht

Belanghebbenden stellen dat het Wob-verzoek buiten behandeling moet worden gelaten, omdat er sprake zou zijn van misbruik van recht. Betoogd wordt dat het er bij de Wob-verzoeker vooral om gaat om vergunninghouders te identificeren en zoveel mogelijk van hun activiteiten te achterhalen. Gezien de grote hoeveelheid vergunningen die reeds geopenbaard is, valt immers niet in te zien dat de Wob-verzoeker er redelijkerwijs belang bij heeft om van nog meer vergunningen en documenten openbaar te maken.

De redenen die tot op heden zijn aangedragen ter onderbouwing van het argument dat er misbruik zou zijn van recht vinden wij te algemeen. De CCD is dan ook van oordeel dat het indienen van veel Wob-verzoeken op dit moment en onder de huidige omstandigheden onvoldoende reden is om de Wob-verzoeker misbruik van recht te verwijten. Het Wob-verzoek wordt om deze reden inhoudelijk behandeld.

7.2. Wob vs Wod en Europese regelgeving

Belanghebbenden verzoeken om de openbaarmaking van alle documenten geheel te weigeren. Hierbij wordt verwezen naar artikel 43 de Europese richtlijn 2010/63/EU (hierna: Richtlijn) en de Europese richtlijn 2010/63/EU om aan te geven dat openbaarmaking van meer informatie dan de NTS-en in conflict is met deze richtlijn. Tevens wordt verwezen naar artikel 39 van het Europees verdrag inzake de handelsaspecten van intellectueel eigendom (TRIPs), naar artikel 8 van het Europees Verdrag voor de Rechten van de Mens (EVRM), artikel 7 van het Handvest voor de Grondrechten van de EU (Handvest) en naar artikel 4, lid 3 van het Verdrag betreffende de Europese Unie (VEU).

Richtlijn

Er wordt gesteld dat op grond van de Richtlijn slechts de NTS openbaar gemaakt mag worden. Op grond van artikel 4, derde lid, van de Dierproevenregeling 2014 dient de aanvrager ervoor te zorgen dat de NTS anoniem is en geen namen en adressen van de gebruiker en zijn personeel bevat. De richtlijn schrijft voor welke gegevens de NTS bevat en welke niet (artikel 43, eerste lid van de richtlijn). Deze bepaling is vrijwel letterlijk geïmplementeerd in de Wet op de dierproeven (Wod) en het Dierproevenbesluit.

Uit de parlementaire geschiedenis van de Wod[1] volgt dat de Wod *geen* bijzondere openbaarmakingsregeling is. Dit is bevestigd in de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (kenmerk: AWB 15/6463, zie ook ECLI:NL:RVS:2017:680). Uit de uitspraak van de rechtbank Utrecht van

[1] Tweede Kamer vergaderjaar 2013-2014, 33692, 24, blz. 4, 13 en 20, Eerste Kamer vergaderjaar 2013-2014, 33 692, D, blz. 8 Tweede Kamer vergaderjaar 2012-2013, 33 692, nr. 3, blz. 12, 14 en 17, Tweede Kamer vergaderjaar 1986-1987, 19859, nr. 2, blz. 19 en 23

3 december 2009 (ECLI:NL:RBUTR:2009:BK8206) volgt onder meer dat indien de wetgever uitdrukkelijk voor ogen heeft gestaan de Wob niet van toepassing te verklaren op de Wod dit dient te blijken uit de Memorie van Toelichting of uit de totstandkomingsgeschiedenis van de Wod. Uit de Memorie van Toelichting van de Wod en uit de totstandkomingsgeschiedenis van de Wod blijkt echter in het geheel niet dat de Wob buiten beschouwing gelaten dient te worden. Dit betekent dat de Wob volledig van toepassing op de behandeling van het voorliggende Wob-verzoek.

TRIPs
Er wordt betoogd dat artikel 39 van het TRIPs-verdrag directe werking heeft ofwel voorgaat op de Wet openbaarheid bestuur. Hierover wil de CCD het volgende aangeven.

Nederland is verdragspartij bij het TRIPs-verdrag en dit verdrag is door de EU goedgekeurd. Het TRIPs-verdrag voorziet expliciet in de bescherming van bedrijfsgeheimen en andere niet openbaar gemaakte informatie. Artikel 39 lid 3 TRIPs schrijft voor dat leden de gegevens tegen oneerlijke concurrentie beschermen. Het TRIPs-verdrag maakt onderdeel uit van het Wereldhandelsverdrag. Het Hof van Justitie heeft vanaf 1999 consequent bepaald dat het Wereldhandelsverdrag geen rechtstreekse werking heeft[2]. Dit betekent dat de lidstaten het verdrag dienen te implementeren op basis van Europese of nationale regelingen en dat een rechtstreeks beroep op TRIPs niet kan slagen.

De bescherming van bedrijfsgeheimen is gewaarborgd in artikel 10, lid 1 sub c van de Wob. Hiermee is de beoordeling conform de Wob niet in strijd met artikel 39 lid 3 TRIPs. De vraag of de gegevens wel of niet mogen worden verstrekt, kan dus worden beantwoord na afweging van het bepaalde in de artikelen 10 en 11 van de Wob (en niet artikel 39 TRIPs).

EVRM
Artikel 8 van het EVRM en artikel 7 van het Handvest gaan over de bescherming van persoonsgegevens. De bescherming van de persoonlijke levenssfeer wordt gewaarborgd door artikel 10, lid 2, onderdeel e van de Wob. Hiermee is de beoordeling conform de Wob niet in strijd met artikel 8 van het EVRM.

In het hierna volgende zal dan ook nader ingegaan worden op de afweging om openbaarmaking van (delen) van documenten al dan niet te weigeren op grond van artikel 10 en 11 van de Wob.

7.3. Bedrijfs- en fabricagegegevens
Artikel 10, lid 1 aanhef en onder sub c van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

---

[2] HvJ EG 23 november 1999, C-149/96, Portugal/Raad, overweging 47; HvJ 14 april 2011, gevoegde zaken C-288/09 en C-289/09, ECLI:EU:C:2011:248, r.o. 83 (ITA), ECLI:EU:C:2012:745, r.o. 39 (ITA).

Volgens vaste jurisprudentie dient artikel 10, lid 1 onder c van de Wob restrictief te worden uitgelegd. Om te kunnen spreken van bedrijfs- en fabricagegegevens dient inzichtelijk te zijn dat de informatie in de betreffende onderdelen van de documenten, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, zijn 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 de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Ook gegevens die uitsluitend de financiële bedrijfsvoering betreffen, kunnen onder omstandigheden als bedrijfsgegevens worden aangemerkt. Daarbij zal de actualiteit van de gegevens moeten worden betrokken. De CCD verwijst in dit kader naar de uitspraak van de Raad van State van 23 december 2015 (ECLI:NL:RvS:2015:3976). In deze uitspraak zijn de namen van leveranciers aangemerkt als bedrijfsgegeven. Details over de onderzoeksopzet kunnen eveneens worden aangemerkt als bedrijfsgegeven. De CCD verwijst in dit kader naar de uitspraak naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811).

Het slechts verwijzen naar het gegeven dat de informatie vertrouwelijk aan de overheid zou zijn verstrekt is onvoldoende voor een beroep op deze weigeringsgrond. Het slechts vermelden dat openbaarmaking van informatie een inkijk zou geven in de bedrijfsvoering van het bedrijf is evenmin voldoende om te oordelen dat het om vertrouwelijke bedrijfs- en fabricagegegevens gaat. Voor het bovenstaande wordt verwezen naar de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: Raad van State) van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976) en de uitspraak van 17 juli 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:288). Een voorbeeld van een uitspraak waarin informatie terecht is aangemerkt als bedrijfs- en fabricagegegevens is de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015, ECLI:NL:RBNNE:2015:4811. Het betrof hier de beoogde onderzoeksopzet.

Instellingsgegevens
Er wordt betoogd dat algemene instellingsgegevens, zoals de naam van de instelling, het deelnemernummer bij de NVWA, het KvK-nummer en het IBAN-rekeningnummer, onder de bedrijfsgegevens vallen waarvan openbaarmaking op grond van artikel 10, lid 1 aanhef en onder sub c van de Wob geweigerd zou moeten worden.

De CCD is van oordeel dat met betrekking tot deze instellingsgegevens van vergunninghouders en DEC's niet gesproken kan worden van bedrijfsgegevens. Hierbij verwijst de CCD naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland 12 juni 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:3654). In deze uitspraak geeft de rechtbank aan dat het deelnemernummer of de naam dan wel aanduiding van een organisatorische werkeenheid van vergunninghouder niet valt aan te merken als bedrijfs- of fabricagegegeven. Openbaarmaking van algemene instellingsgegevens wordt niet op deze weigeringsgrond geweigerd.

7.4. Persoonsgegevens
Conform artikel 10, lid 1 aanhef en onder sub d van de Wob blijft het verstrekken van informatie achterwege voor zover het persoonsgegevens betreft als bedoeld in paragraaf 2 van hoofdstuk 2 van de Wet bescherming persoonsgegevens, tenzij de verstrekking kennelijk geen inbreuk op de persoonlijke levenssfeer maakt.

Diverse belanghebbenden verwijzen in hun zienswijze naar deze weigeringsgrond. Deze weigeringsgrond is niet van toepassing op dit Wob-verzoek. Hoofdstuk 2 van de Wet bescherming persoonsgegevens heeft namelijk betrekking op persoonsgegevens over iemands godsdienst of levensovertuiging, ras, politieke gezindheid, gezondheid, seksuele leven, iemands lidmaatschap van een vakvereniging of strafrechtelijke persoonsgegevens. In de stukken waarop dit Wob-verzoek betrekking heeft is er geen sprake van dergelijke gegevens.

7.5. Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

Op grond van artikel 10, lid 2 aanhef en onder sub e van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

Voor alle vergunningen waarop dit Wob-verzoek betrekking heeft, wordt de openbaarmaking geweigerd van de gegevens die direct te herleiden zijn naar personen:

- namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen,
- directe telefoonnummers en directe e-mailadressen,
- de functies van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen, tenzij het een algemene functiebenaming betreft die niet naar een persoon herleidbaar is,
- handtekeningen en eventueel faxadressen en rekeningnummers indien deze direct herleidbaar zijn tot personen,
- literatuurverwijzingen naar de eigen onderzoeksgroep,
- kamernummers en namen van afdelingen, met name als de afdelingen zo klein zijn dat betrokkenen eenvoudig te herleiden zijn in combinatie met de naam van de vergunninghouder.

Deze gegevens staan vermeld in de aanvraagformulieren, de ontvangen en verzonden brieven, ontvangen en verzonden e-mails en de vergunningen en beschikkingen.

De CCD is van oordeel dat ten aanzien van deze gegevens, voor alle vergunningen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid. Daarbij is van belang dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. De CCD licht dit als volgt toe.

Uit de Memorie van Toelichting bij de Wet op de dierproeven (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) volgt dat de belangen van de bescherming van de gegevens die herleidbaar zijn naar personen in afweging tot openbaar maken van deze gegevens zwaar moet wegen. Betrokkenen moeten vrijelijk en anoniem hun werk kunnen doen. Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme.

In dit kader zoekt de CCD ook aansluiting bij een uitspraak van de Raad van State van 31 januari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:321). Hieruit 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 de openbaarheid in een concreet geval zwaarder weegt.

Uit de uitspraak van de Raad van State van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:CA2883) volgt dat ambtenaren met een publieke functie en de in de openbaarheid tredende ambtenaren die besluiten krachtens mandaat hebben ondertekend in beginsel wel moeten aanvaarden dat hun namen met de ondertekening van de besluiten naar buiten komen. De naam van de secretaris van de CCD wordt dan ook openbaar gemaakt.

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

Wanneer men de publicaties van het DTN van de afgelopen tien jaren bekijkt, is te zien dat er een golfbeweging is met betrekking tot de mate van acties van dierenrechtenactivisten, waarbij niet valt uit te sluiten dat het dierenrechtenactivisme weer opkomt. Dit is afhankelijk van allerlei factoren, die zich vooraf niet laten voorspellen. Hierdoor is niet in te schatten welke vergunning een dreiging van dierenrechtenactivisme met zich meebrengt. Het gegeven dat in het recente DTN (nummer 48) geen dreigingsbeeld van dierenrechtenactivisten is opgenomen, betekent niet dat (de vrees voor) bedreigingen en intimidatie van het dierenrechten extremisme niet meer actueel zijn. Het dreigingsbeeld toont immers de afgelopen tien jaren een afwisselend beeld met een hoger en minder hoog dreigingsbeeld.

Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt ook uit de recente uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498) en 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492).

Mede gezien deze dreiging voor dierenrechtenactivisme is de CCD met betrekking tot gegevens die direct te herleiden zijn naar personen van oordeel dat de bescherming van de persoonlijke levenssfeer zwaarder weegt dan het belang van de openbaarmaking.

7.6. Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling
Conform artikel 10, lid 2 aanhef en onder sub g van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen, dan wel van derden.

Herleidbaarheid
Diverse vergunninghouders hebben verzocht om weigering van een deel van de documenten aangezien hierin informatie is opgenomen die op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken personen. Dit betekent een onevenredige benadeling van betrokken personen, die niet opweegt tegen de belangen van openbaarmaking. Voor de toelichting verwijst de CCD naar hetgeen is uiteengezet onder 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer'.

Als gevolg hiervan zullen, naast de gegevens die reeds zijn vermeld onder 'eerbiediging van persoonlijke levenssfeer' eveneens de volgende gegevens – die herleidbaar zijn naar personen – uit de documenten worden verwijderd:

- gegevens over proefdierlocaties en sublocaties, zoals straatnaam, postcode, plaats, maar ook het organisatieonderdeel wanneer deze door de betreffende organisatie nog niet zijn geopenbaard, door bijvoorbeeld een vermelding op een website.

In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen kan het voorkomen dat de naam geweigerd wordt van partners waarmee de vergunninghouder samenwerkt. In dit kader verwijst de CCD naar een uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 7 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

De hoofdlocaties van de verschillende instellingen worden, indien er geen bijzondere omstandigheden zijn, geopenbaard. Deze gegevens zijn over het algemeen reeds openbaar. De openbaarmaking van proefdier- dan wel sublocaties die direct tot personen herleidbaar zijn en niet al eerder, bijvoorbeeld door middel van publicatie op een website, zijn geopenbaard, wordt geweigerd. Op de proefdierlocatie worden de proefdieren gehouden en worden de dierproeven uitgevoerd. Deze informatie kan dierenrechtenextremisten aanleiding geven tot bedreiging en intimidaties. Hiervoor kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463). Voor wat betreft de specifieke dierproeflocaties kan tevens aangesloten worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) en de Memorie van Toelichting bij de Wod (*Kamerstukken II* 2012/13, 33692, nr. 3, p. 14).

In dit kader wordt eveneens verwezen naar de uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952), 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498) en 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). De Afdeling stelt in genoemde uitspraken dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Algemene (instellings)gegevens
Diverse vergunninghouders hebben verzocht om de openbaarmaking van algemene (instellings)gegevens te weigeren, zoals de naam van de instelling of DEC, instellingsnummer bij de NVWA, het KvK-nummer en het IBAN-rekeningnummer. De vergunninghouders geven aan dat de combinatie van het project en de instellingsgegevens eenvoudig te herleiden zijn naar individuele personen. Met name indien het een kleine afdeling betreft met een zeer beperkte groep onderzoekers. Zij verzoeken om deze reden de openbaarmaking van deze gegevens te weigeren in verband met de vrees voor dierenrechtenactivisten. De context dan wel bijzonderheden van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de vergunninghouder of adviserende DEC kunnen reden zijn voor het weigeren van hun bedrijfsnamen (verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016, AWB 15/6463).

Bij het verzoek om dergelijke gegevens te weigeren overweegt de CCD of er sprake is van een bijzondere situatie. Indien er sprake is van een bijzondere situatie kan er in bepaalde gevallen aanleiding zijn tot weigering van de naam van algemene instellingsgegevens zoals de naam van een vergunninghouder en/of de adviserende DEC. Van een bijzondere situatie kan bijvoorbeeld gesproken worden bij een actuele dreiging en/of aantoonbare dreigingen jegens de vergunninghouder of DEC, in bijvoorbeeld de vorm van acties van dierenrechtenactivisten. Indien er geen bijzondere situatie is worden deze gegevens geopenbaard.

Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van bedrijfsnamen van vergunninghouders versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel ander aard en kent ook een ander gewicht.

Literatuurverwijzingen
Diverse vergunninghouders hebben verzocht om weigering van literatuurverwijzingen, of verwijzingen naar eerder onderzoek van de onderzoeksgroep, in verband met de herleidbaarheid naar personen.

De CCD is van oordeel dat het belang van openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen de onevenredige benadeling als gevolg van de herleidbaarheid naar de betrokken personen, dan wel de bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen. Indien de literatuurverwijzingen afkomstig zijn van bij deze onderzoeken betrokken personen, rechtstreeks verwijzen naar, of rechtstreeks zouden leiden naar betrokken personen, dan worden de literatuurverwijzingen geanonimiseerd. In enkele gevallen wordt eveneens de openbaarmaking geweigerd van verwijzingen naar eerdere onderzoeken van de betreffende onderzoeksgroep. De reden hiervoor is dat op basis van de betreffende kernwoorden en de openbare gegevens over het onderzoek in diverse zoekmachines eenvoudig is te achterhalen welke onderzoekers bij het project betrokken zijn.

Voorkomen van fraude
Wanneer de CCD handtekeningen van betrokkenen openbaar maakt, zijn deze eenvoudig te kopiëren. Het is niet uitgesloten dat kwaadwillende personen deze handtekeningen gebruiken voor frauduleuze doeleinden. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling weegt de CCD hier zwaarder dan het belang van openbaarmaking. Derhalve zijn in alle besluiten en overige brieven de handtekeningen geanonimiseerd.

Concurrentiegevoelige informatie
1. Onderzoeksstrategie
Een aantal vergunninghouders heeft verzocht om weigering van concurrentiegevoelige informatie waarvan de openbaarmaking niet opweegt tegen de onevenredige bevoordeling of benadeling. Dit betreft specifieke gegevens over de gebruikte materialen/stoffen/vaccins en technieken in de onderzoeken van vergunninghouders. Hiermee wordt in specifieke gevallen essentiële informatie gegeven over de onderzoeksdoelstelling, onderzoeksopzet, onderzoeksstrategie, de stappen van het onderzoek en/of de fase waarin het onderzoek zich bevindt. Deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, aangezien concurrerende onderzoekers de informatie kunnen gebruiken voor het eigen onderzoek en zo bijvoorbeeld als eerste patent kunnen aanvragen. Als gevolg hiervan zorgt openbaarmaking voor een onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers.

2. Publicaties
In aanvulling hierop wijst de CCD op het volgende. Het is een algemeen geldende, ongeschreven regel van (academisch) onderzoek op het terrein van medische en biologische wetenschappen, dat een onderzoeksrapport waaruit al eerder gegevens, analyses of resultaten openbaar zijn gemaakt, in beginsel niet meer voor acceptatie door een gerenommeerd wetenschappelijk tijdschrift in aanmerking komt. Daar waar gegevens herleidbaar zijn tot de onderzoeksstrategie kunnen andere onderzoekers deze overnemen. Met name in de beginfase van een onderzoek zou dit tot onevenredige bevoordeling van de concurrerende onderzoeksgroepen leiden. Openbaarmaking van specifieke informatie kan daarnaast publicatie in wetenschappelijke tijdschriften verhinderen. Het is een gegeven dat het van wezenlijk belang is voor wetenschappelijk onderzoekers om als eerste te kunnen publiceren in gerenommeerde tijdschriften. Als openbaarmaking van informatie toekomstige publicaties in de weg staat, zorgt dit voor een onevenredige benadeling van betrokken onderzoekers. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4555).

3. Financiële schade/imagoschade
De onevenredige benadeling als gevolg van het vroegtijdig openbaar maken van specifieke informatie kan tevens zien op het financiële nadeel en de imagoschade die vergunninghouders lijden indien zij geen patent kunnen aanvragen, eerste publicatie mislopen en/of concurrerende onderzoekers de informatie gebruiken voor het eigen onderzoek.

Het voorgaande betekent dat indien voldoende inzichtelijk is dat openbaarmaking van concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie inderdaad leidt tot voordeel voor andere ondernemingen en/of onevenredige benadeling van de vergunninghouder

en/of DEC, openbaarmaking van de betreffende delen van de informatie op grond van deze weigeringsgrond wordt geweigerd.

Naam onderzoekspartners en leveranciers
Een aantal vergunninghouders heeft verzocht om de namen van de onderzoekspartners en leveranciers niet te openbaren. De desbetreffende vergunninghouders vrezen dat, zodra de namen van onderzoekspartners en leveranciers zijn geopenbaard, deze partijen te maken krijgen met dierenrechtactivisme. Openbaarmaking van de namen van deze partijen zou ertoe kunnen leiden dat onderzoekspartners en leveranciers de samenwerking met vergunninghouders opzeggen. De CCD is van mening dat het belang van openbaarmaking van de namen van onderzoekspartners en leveranciers niet opwegen tegen de belangen van vergunninghouders, aangezien openbaarmaking in het uiterste geval kan leiden tot het stopzetten van projecten van de desbetreffende vergunninghouders.

7.7. Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk bestemd voor intern beraad
Artikel 11, lid 1 van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt vertrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad is het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend. Uit de uitspraak van de Raad van State 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, bl. 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."*

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 Raad van State van 21 december 2016 en de uitspraak van de Raad van State 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 Raad van State 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.

Aan de adviezen over de vergunningen die onder dit verzoek vallen, heeft een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren gewerkt. 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 persoonlijke beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan reeds in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld. U kunt deze verslagen (met gebruikmaking van de zoekfunctie) vinden op de website van de CCD. Hiermee is deze informatie reeds openbaar.

Het voorgaande betekent dat voor alle NTS-nummers de openbaarmaking wordt geweigerd van de adviezen van het secretariaat van de CCD aan het bestuur.

Een vergunninghouder heeft verzocht om eerdere versies van het projectvoorstel, bijlage dierproeven en niet-technische samenvatting te weigeren daar de informatie in deze vermeende concepten, waar deze afwijkt van de informatie in de uiteindelijke (definitieve) documenten, persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten. Zij verwijst hiervoor naar een uitspraak van de Raad van State van 5 december 2012 (ECLI:NL:RVS:2012:BY5117).

Naar het oordeel van de CCD bevat de informatie in voornoemde documenten geen persoonlijke beleidsopvattingen. Alle versies van deze documenten zijn ten behoeve van een aanvraag bij de CCD ingediend. De ingediende documenten zijn geen onderwerp meer van beraad voor vergunninghouder. Dat over een ingediende aanvraag nog vragen worden gesteld, maakt dat niet anders. De aanvraag zelf of mogelijk eerdere versies daarvan bevatten tot slot geen van de CCD afkomstige persoonlijke beleidsopvattingen. Overigens wijken de definitieve versies op slechts kleine (zins)onderdelen af van de eerdere versies, waarvan niet wordt aangevoerd dat deze persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten.

Het feit dat de definitieve versies slechts op kleine (zins)onderdelen afwijken van de eerdere versies geeft voor de CCD wel aanleiding om eerdere versies niet separaat te openbaren. De CCD zoekt hiervoor aansluiting bij artikel 7, lid 2, sub b van de Wob. De verschillen tussen versies volgen reeds uit de correspondentie tussen de aanvrager en de CCD, en/of uit het advies van de DEC – meer specifiek onderdeel A van het advies. Uit dit onderdeel volgt welke vragen de DEC heeft gesteld aan de aanvrager, de antwoorden van de aanvrager, en tot welke

aanpassingen van de aanvraag dit geleid heeft. Voor het overige komen de versies exact overeen, waarmee de verzochte informatie beschikbaar is.

8. Beoordeling per vergunning

Voor alle vergunningen wordt de openbaarmaking geweigerd van gegevens die direct te herleiden zijn naar personen zoals namen van onderzoekers en contactpersonen, directe telefoonnummers en directe e-mailadressen, functies van personen, sub-locaties, handtekeningen, en eventueel faxadressen en rekeningnummers die direct herleidbaar zijn tot personen (op grond van zowel artikel 10, lid 2, onderdeel e als onderdeel g van de Wob). Deze gegevens staan met name op de aanvraagformulieren, de ontvangen en verzonden brieven en e-mails en de vergunningen en beschikkingen. Voor de onderbouwing van de weigering tot openbaarmaking verwijzen wij naar paragraaf 7.5.

De namen van afdelingen of organisatieonderdelen worden geweigerd indien deze zo klein zijn dat betrokkenen eenvoudig te herleiden zijn. De vermelding van kamernummers wordt geweigerd, aangezien deze in combinatie met de adresgegevens direct zijn te liëren aan de betrokken onderzoekers.

Algemene adressen en rekeningnummers die reeds door de organisatie zijn geopenbaard door bijvoorbeeld een vermelding op een website, worden wel geopenbaard.

De aard van bovenstaande geweigerde gegevens is direct af te leiden uit de opbouw en de context van de documenten.

Voor de vergunningen waarvan de openbaarmaking op overige onderdelen wordt geweigerd, volgt hieronder per NTS een toelichting. In de inventarislijsten is met een kruisje aangegeven of het document geheel wordt geopenbaard, gedeeltelijk wordt geopenbaard of volledig wordt geweigerd. In kolommen is per document eveneens met een kruisje aangegeven welke wettelijke weigeringsgrond van toepassing is op de niet te openbaren informatie. Uit vaste jurisprudentie volgt dat met de gebruikte tabellen 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.

1. NTS2017775

Voor NTS2017775 worden naast de persoonsgegevens ook de naam van de afdeling geweigerd. De omvang van de afdeling is dermate gering dat de combinatie van de afdelingsnaam en de functie kan leiden naar specifieke individuen.

2. NTS2017867

Van NTS2017867 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

Vergunninghouder heeft tevens verzocht om eerdere versies van het projectvoorstel, bijlage dierproeven en niet-technische samenvatting te weigeren daar de informatie in deze vermeende concepten, waar deze afwijkt van de informatie in de uiteindelijke (definitieve) documenten, persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten. Zij verwijst hiervoor naar een uitspraak van de Raad van State van 5 december 2012 (ECLI:NL:RVS:2012:BY5117).

Naar het oordeel van de CCD bevat de informatie in voornoemde documenten geen persoonlijke beleidsopvattingen. Alle versies van deze documenten zijn ten behoeve van een aanvraag bij de CCD ingediend. De ingediende documenten zijn geen onderwerp meer van beraad voor vergunninghouder. Dat over een ingediende aanvraag nog vragen worden gesteld, maakt dat niet anders. De aanvraag zelf of mogelijk eerdere versies daarvan bevatten tot slot geen van de CCD afkomstige persoonlijke beleidsopvattingen. Overigens wijken de definitieve versies op slechts kleine (zins)onderdelen af van de eerdere versies, waarvan niet wordt aangevoerd dat deze persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten.

3. NTS2017869

Van NTS2017869 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

Vergunninghouder heeft tevens verzocht om eerdere versies van het projectvoorstel, bijlage dierproeven en niet-technische samenvatting te weigeren daar de informatie in deze vermeende concepten, waar deze afwijkt van de informatie in de uiteindelijke (definitieve) documenten, persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten. Zij verwijst hiervoor naar een uitspraak van de Raad van State van 5 december 2012 (ECLI:NL:RVS:2012:BY5117).

Naar het oordeel van de CCD bevat de informatie in voornoemde documenten geen persoonlijke beleidsopvattingen. Alle versies van deze documenten zijn ten behoeve van een aanvraag bij de CCD ingediend. De ingediende documenten zijn geen onderwerp meer van beraad voor vergunninghouder. Dat over een ingediende aanvraag nog vragen worden gesteld, maakt dat niet anders. De aanvraag zelf of mogelijk eerdere versies daarvan bevatten tot slot geen van de CCD afkomstige persoonlijke beleidsopvattingen. Overigens wijken de definitieve

versies op slechts kleine (zins)onderdelen af van de eerdere versies, waarvan niet wordt aangevoerd dat deze persoonlijke beleidsopvattingen zou bevatten.

Verder worden een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

4. NTS2017890

Voor NTS2017890 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder worden een aantal kernwoorden de benaming van een gebruikt diermodel geweigerd, omdat uit deze informatie de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

5. NTS2017903

Van NTS2017903 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

6. NTS2017946

Voor NTS2017946 wordt een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

7. NTS20171124

Van NTS20171124 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één

individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

8. NTS20171185

Voor NTS 20171185 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder worden een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

9. NTS20171287

Voor NTS20171287 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

10. NTS20171344

Van NTS20171344 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

11. NTS20171664

Voor NTS20171664 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers.

12. NTS20171666

Voor NTS20171666 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder worden een aantal kernwoorden geweigerd, omdat uit deze informatie de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

13. NTS20171667

Voor NTS20171667 wordt een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

14. NTS20171765

Voor NTS20171765 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder worden een aantal kernwoorden geweigerd, omdat uit deze informatie de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

15. NTS20171767

Voor NTS20171767 wordt een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

16. NTS20172125

Voor NTS20172125 wordt een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

17. NTS20172327

Voor NTS20172327 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

18. NTS20172348

Voor NTS 20172348 wordt de openbaarmaking geweigerd van enkele literatuurverwijzingen, omdat deze verwijzingen namen bevatten van betrokken onderzoekers. Verder worden een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

19. NTS20172425

Van NTS20172425 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

20. NTS20172726

Voor NTS20172726 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

21. NTS20172744

Voor NTS20172744 wordt een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid.

22. NTS20172804

Van NTS20172804 wordt de openbaarmaking van de naam van de vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens geweigerd. Openbaarmaking van het NTS-nummer leidt er niet toe dat er naar de vergunninghouder herleidbare gegevens worden geopenbaard.

De openbaarmaking van de naam van de DEC wordt eveneens geweigerd, omdat de naam en de adresgegevens van de DEC direct zijn te relateren aan één individu. Bovendien vreest de vergunninghouder en de DEC dat openbaarmaking van de naam en de vestigingsplaats van de DEC kan leiden tot ongewenst dierenrechtactivisme.

Verder wordt een aantal kernwoorden en bestanddelen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

Informatie zoals opgenomen in de NTS wordt niet gelakt, omdat de NTS reeds openbaar is gemaakt.

23. NTS20172885

Voor NTS20172885 is één literatuurverwijzing gelakt, omdat deze verwijzing de naam bevat van een betrokken onderzoeker.

24. NTS20172905

Voor NTS20172905 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

25. NTS20173084

Voor NTS20173084 wordt een aantal kernwoorden en afbeeldingen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden en afbeeldingen de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

26. NTS20173104

Voor NTS20173104 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

27. NTS20173105

Voor NTS20173105 wordt een aantal kernwoorden en afbeeldingen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden en afbeeldingen de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

28. NTS20173124

Voor NTS20173124 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

29. NTS20173165

Voor NTS20173165 worden geen aanvullende specifieke gegevens geweigerd.

30. NTS20173184

Voor NTS20173184 wordt een aantal kernwoorden en afbeeldingen gelakt uit het projectvoorstel, omdat uit deze kernwoorden en afbeeldingen de onderzoeksstrategie van vergunninghouder kan worden afgeleid. Tevens zijn in het projectvoorstel een aantal nog niet gepubliceerde behaalde onderzoeksresultaten van vergunninghouder gelakt. Het voortijdig openbaar

maken van deze preliminaire data kan voor concurrenten aanleiding zijn om een vergelijkbaar onderzoek op te zetten en de resultaten van deze onderzoeken eerder te publiceren dan vergunninghouder. De bij vergunninghouder werkzame onderzoekers worden daardoor onevenredig benadeeld mede omdat het vervolgens onmogelijk is om een patent te vestigen op reeds gepubliceerde informatie.

9. Wijze van openbaarmaking

De verwachting bestaat dat (derden)belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie. Derhalve vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten – conform artikel 6 lid 5 van de Wob – **niet eerder plaats dan vier weken na dagtekening van dit besluit**. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking van de documenten tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een bezwaarschrift bij de CCD én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om – bij wijze van voorlopige voorziening – het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. De documenten die met dit besluit voor eenieder openbaar worden, zullen na afloop van bovengenoemde termijn op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) worden geplaatst.

Indien binnen vier weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is ontvangen en een (pro forma) bezwaarschrift is ingediend, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

Ik vertrouw erop dat ik u hiermee voldoende heb geïnformeerd.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,
namens deze,

[redacted]

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bezwaar
Indien u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift kunt u sturen naar de Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief.
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. 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 www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**documenten NTS2017775**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven oud			x					
5	Ontvangstbevestiging				x		x		
6	DEC-advies				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Bijlage dierproeven nieuw			x					
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 2017890**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven 1				x		x		
5	Bijlage dierproeven 2				x		x		
6	Tabel Animal Data			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek en reactie aanvulling aanvraag				x		x		
10	Aanvulling reactie				x		x		
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 2017946**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven 1 oud				x	x	x	x	
5	Bijlage dierproeven 2				x	x	x	x	
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Bijlage dierproeven 1 nieuw				x	x	x	x	
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171185**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Adviesnota CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171287**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Bijlage dierproeven nieuw			x					
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171664**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven oud				x	x	x	x	
5	DEC-advies oud				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoeken aanvulling adviezen				x		x		
8	DEC-advies nieuw				x		x		
9	DEC-advies nieuwst				x		x		
10	Bijlage dierproeven nieuw				x	x	x	x	
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171666**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Adviesnota CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171667**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel oud				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud								
4	Bijlage dierproeven 1 oud				x	x		x	
5	Bijlage dierproeven 2 oud				x	x		x	
6	Bijlage dierproeven 3 oud				x	x		x	
7	Bijlage dierproeven 4 oud				x	x		x	
8	Bijlage dierproeven 5 oud				x	x		x	
9	Bijlage dierproeven 6 oud				x	x		x	
10	Bijlage dierproeven 7 oud				x	x		x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x		
12	Brief verlenging termijn				x		x		
13	DEC-advies				x		x		
14	Projectvoorstel nieuw				x	x		x	
15	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
16	Bijlage dierproeven 1 nieuw				x	x		x	
17	Bijlage dierproeven 2 nieuw				x	x		x	
18	Bijlage dierproeven 3 nieuw				x	x		x	
19	Bijlage dierproeven 4 nieuw				x	x		x	
20	Bijlage dierproeven 5 nieuw				x	x		x	
21	Bijlage dierproeven 6 nieuw				x	x		x	
22	Bijlage dierproeven 7 nieuw				x	x		x	
23	Vraag aan DEC en reactie				x		x		
24	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
25	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
26	Adviesnota CCD		x						x
27	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171765**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven oud				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek en reactie aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Bijlage dierproeven nieuw				x	x	x	x	
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20171767**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Adviesnota CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172125**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage dierproeven 1				x	x		x	
5	Bijlage dierproeven 2 oud				x	x		x	
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Bijlage dierproeven 2 nieuw				x	x		x	
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172327**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
9	Projectvoorstel nieuw			x					
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw			x					
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172348**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x	x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag 1				x		x		
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw			x					
10	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw				x	x	x	x	
11	Verzoek aanvulling aanvraag 2				x		x		
12	Niet-technische samenvatting nieuwst	x							
13	Bijlage beschrijving dierproeven nieuwst				x	x	x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172425**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172726**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172744**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				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		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek en reactie aanvulling				x		x		
8	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
9	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw				x	x		x	
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172804**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x	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	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x	x	x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x	x	x	x	
8	DEC-advies				x		x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
11	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
12	Projectvoorstel nieuw				x	x	x	x	
13	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
14	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x	x	x	x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x	x	x	x	
16	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x	x	x	x	
17	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw				x	x	x	x	
18	Advies CCD		x						x
19	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172885**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier oud				x		x		
2	Projectvoorstel oud				x		x		
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek en reactie aanvulling				x		x		
8	Aanvraagformulier nieuw				x		x		
9	Projectvoorstel nieuw				x		x		
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw			x					
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20172905**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Adviesnota CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20173084**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x		x	
8	DEC-advies				x		x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
11	Reactie aanvulling aanvraag				x		x		
12	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20173104**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20173105**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x		x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20173124**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
12	Adviesnota CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20173165**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud			x					
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
9	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
10	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw			x					
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				**weigeringsgronden**			
nr.	**Documenten 20173184**	**reeds openbaar**	**niet**	**geheel**	**deels**	**10.1.c**	**10.2.e**	**10.2.g**	**11.1**
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x	x		x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x	x		x	
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x		
10	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x	x		x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x	x		x	
13	Adviesnota CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x		

AVD1180020167775

2 1 AUG 2017

Centrale Commissie Dierproeven

1.

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11800
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	343362777	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31
Postbus		
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam
IBAN	NL68RABO0136166741	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC	

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] [redacted]
Functie	[redacted] Onderzoeker
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	[redacted]
E-mailadres	[redacted]

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

(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
E-mailadres	

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ 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 - 1 - 2017
		Einddatum	30 - 11 - 2021
3.2	Wat is de titel van het project?	RescU1 Splicing	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Correctie van splicingsdefecten bij erfelijke ziekten	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC AMC
		Postadres	Meibergdreef 31
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € variabel; check dit Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☒ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Amsterdam
Datum	17 - 08 - 2017
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center Amsterdam
1.3	Vul de titel van het project in.	RescU1 Splicing

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

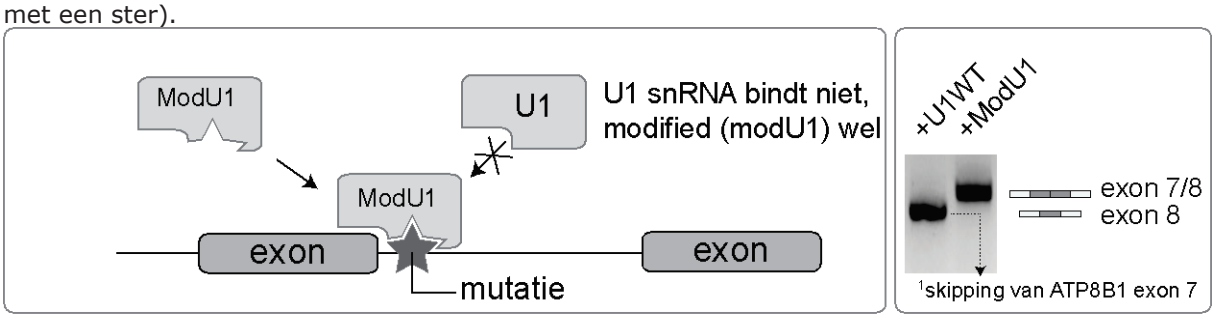
3.1 Achtergrond

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.

Erfelijke ziekten komen individueel allemaal weinig voor, terwijl toch geschat wordt dat ~35 miljoen

mensen in Europa een zeldzame (vaak erfelijke) ziekte hebben. Goede medicijnen zijn voor veel van deze ziekten niet beschikbaar. Recentelijk is een mogelijk breed-toepasbare manier ontdekt om erfelijke splicingsdefecten te behandelen bij zeer diverse ziekten.
"Splicing" is een onderdeel van het proces waarbij de genetische informatie in het DNA vertaald wordt naar een werkend eiwit. Slechts een deel van het DNA bevat eiwit-coderende informatie (exonen). Bij pre-mRNA splicing worden de delen tussen de exonen (genaamd 'intronen') weggehaald zodat de exonen naadloos aan elkaar komen. Bij erfelijke mutaties in gebieden dichtbij exon-intron overgangen gaat dit proces vaak mis en het wordt geschat dat bij ruim 15% van alle erfelijke ziekten een splice-defect de reden is. Het lijkt mogelijk om aangedane cellen in het lichaam te instrueren hoe om te gaan met het erfelijke defect en toch het pre-mRNA correct te splicen. Onze strategie hiertoe is het in cellen tot expressie brengen van een gemodificeerd onderdeel (modU1) van de cellulaire splicingsmachinerie (U1snRNA). Op dit moment is alleen nog gekeken of het splicingprobleem hiermee opgelost werd in een laboratoriumsetting. Eventuele bij-effecten, en effectiviteit in vivo, is nog nauwelijks onderzocht.
Het U1 small nuclear RNA (snRNA) rekruteert de cellulaire splicingsmachinerie naar pre-mRNA. Hierbij zijn 9 nucleotiden in dit kleine RNA van belang die zorgen dat het aan pre-mRNA kan binden. Door een gemodificeerd U1 snRNA (met puntmutaties in (enkele van) deze 9 nucleotiden die de base-paring aan het mRNA herstellen) tot expressie te brengen, kan een splice-defect vaak effectief behandeld worden in vitro.
In het voorbeeld hieronder zorgde dit dat het ATP8B1 eiwit *in vitro* weer goed gemaakt werd, terwijl er zonder behandeling een deel (exon 7) ontbrak doordat er een foutje in het DNA zit (mutatie, aangegeven met een ster).



Doel van het hier voorgestelde project is onderzoeken of gemodificeerde U1s snRNA veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief splice-defecten kunnen verhelpen die leiden tot Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie en type I tyrosinemie. Patiënten met OTC deficiëntie missen een enzym in de ureumcyclus, wat leidt tot de levensbedreigende ophoping van o.a. het toxische ammoniak in het lichaam. Patiënten overleven op een speciaal (erg ingrijpend) eiwitarm dieet (levenslang) in combinatie met behandeling met medicijnen zoals fenylbutyraat, wat in het lichaam wordt omgezet tot fenylacetylglutamine en zorgt dat stikstof het lichaam vellig kan verlaten en ammoniakspiegels beperkt kunnen worden. Deze afstemming van dieet en medicatie is vaak erg moeizaam en bij sommige patiëntjes met minimale OTC restactiviteit lukt het soms helemaal niet en kunnen deze snel in coma raken en zelfs sterven. Er is dus behoefte aan betere behandelings-opties.
OTC deficiëntie wordt in een deel van de patiënten veroorzaakt door een splicing defect IVS4-1G>A op een positie die zich goed leent voor therapie met gemodificeerd U1 snRNA en is er een muismodel met exact deze splice-site-mutatie. Het OTC gen ligt op het X-chromosoom, en dit zorgt ervoor dat vooral jongetjes getroffen worden door de ziekte. Ook bij muizen ligt het gen op het X-chromosoom. We zullen dan ook alleen mannetjesmuizen gebruiken in het deel van de studie dat zich richt op OTC deficiëntie.
Met behulp van 'mini-genen', plasmiden met een klein stukje van het OTC-gen hebben we in vitro al bepaald welke verandering in de U1 snRNA sequentie OTC-splicing corrigeert. Dit geldt zowel voor 'muis' als 'humane' mini-genen. De beste gemodificeerde U1 snRNAs worden met een adeno-associated virus (AAV)(M. S. Sands, Methods in molecular biology 2011) in de lever van levende muizen met een OTC-splicedefect gebracht. Langdurig overleving na de overgang op een eiwitrijk dieet en vermindering van ammoniakconcentratie in het bloed is een maat voor succes van de behandeling.
Patiënten met tyrosinemie type 1 (ook wel fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) deficiëntie genaamd) missen een enzym in de afbraakroute van tyrosine wat leidt tot de levensbedreigende ophoping van toxisch en carcinogeen product in de lever. Patiënten overleven op een speciaal (erg ingrijpend) eiwitarm

dieet in combinatie met behandeling met NTBC, een stof die het enzym remt upstream van FAH, waardoor minder toxische metabolieten accumuleren. Deze behandeling is niet altijd effectief en de kans op levertumoren blijft groot, ook in de patiënten die goed reageren op NTBC. Ook bij deze ziekte is dus behoefte aan betere behandelingsopties. FAH deficiëntie wordt in ruim 1/3 van de patiënten veroorzaakt door een splicing defect (IVS12+5 g>a) op een positie die zich goed leent voor therapie met gemodificeerd U1 snRNA en er is een muismodel met een vergelijkbare splice-site-mutatie. Het muisfenotype is duidelijk gekarakteriseerd; de muizen overleven alleen in aanwezigheid van NTBC. Met behulp van 'mini-genen', plasmiden met een klein stukje van het FAH-gen bepalen we welke verandering in de U1 snRNA sequentie FAH-splicing corrigeert *in vitro*. Dit bepalen we met 'muis' en 'humane' mini-genen. De beste gemodificeerde U1 snRNA voor 'muis' FAH worden met een adeno-associated virus (AAV) in de lever van muizen met een FAH-splicedefect gebracht. Langdurig overleving na het stoppen met NTBC en een vermindering van ontstaan van levertumoren is een maat voor succes van de behandeling.

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 is onderzoeken of gemodificeerde U1 snRNAs veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief splice-defecten kunnen verhelpen in OTC en FAH deficiëntie. Specifiek in dit project willen we testen of deze strategie geschikt is voor tyrosinemie en OTC deficiëntie, en het lange termijn doel is het voor patiënten beschikbaar krijgen van nieuwe behandelingen voor stofwisselingsziekten waarbij splicedefecten de oorzaak vormen. Voordat we voor deze ziekten klinische trials met gemodificeerde U1 snRNAs kunnen starten is nog veel onderzoek nodig. Allereerst moet worden onderzocht of gemodificeerde U1 snRNAs *in vivo* effectief en veilig zijn.

Haalbaarheid:
Het dierenlab van mijn instituut is toegerust met een faciliteit voor in vivo experimenten met adeno-associated virus. Deze voldoet aan alle voorwaarden m.b.t. isolatie en inperking van materiaal, zodat er geen genetisch veranderd materiaal vrij kan komen. We hebben veel ervaring met virale injecties in proefdieren, ook muizen. Binnen onze onderzoeksgroep is er ruime ervaring met gentherapie, en de experimentele ervaring met injecties en hepatectomie is geborgd bij de analisten op dit project. We hebben al eerdere ervaring met FAH-deficiënte muizen, en goede samenwerkingen met de wereldwijde experts op gebied van FAH deficiëntie en OTC deficiëntie . Er is ruime ervaring in de experimentele handelingen met de levende dieren, met de euthanasie en de analyse van de weefsels die zullen worden uitgenomen na afloop van het dierexperiment.

3.3 Belang

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

Maatschappelijk belang:
OTC en FAH zijn 2 ziektebeelden met een defect in de lever waar een geschikt diermodel voor bestaat om veiligheid en effectiviteit van gemodificeerde U1s snRNA te kunnen onderzoeken. Specifiek voor OTC en FAH deficiëntie is er al wel behandeling mogelijk, maar deze is erg ingrijpend en veelal onvoldoende om levertumoren of levensbedreigende episoden met hyperammonemie te voorkomen (respectievelijk bij FAH- en OTC-deficiëntie). DNA mutaties in de buurt van een exon-intron overgang zorgen voor pre-mRNA splicedefecten in ruim 15% van alle patiënten met erfelijke mutaties. In veel gevallen is er momenteel geen enkele therapie beschikbaar. Dit onderzoek kan bijdragen in de ontwikkeling van nieuwe therapie voor een deel van deze mensen.

Wetenschappelijk belang:
Het is onbekend of gemodificeerde U1s snRNA veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief een splice-defect kunnen verhelpen. Om de effectiviteit te kunnen onderzoeken is het van

belang dat er een ziektebeeld onderzocht wordt waarvan de ernst op verschillende tijdspunten kan worden gemeten, en deze een gevolg is van een verstoorde leverfunctie. Dat is voor zowel het FAH als het OTC diermodel het geval. Gecombineerde analyse van beide ziekten geeft meer inzicht of deze strategie op termijn breed inzetbaar is. We willen kijken of virale toediening van het gemodificeerde U1 snRNA de expressie van FAH en OTC normaliseert in voldoende cellen van de lever. De transductie-efficiëntie wordt beïnvloed door de structuur en doorbloeding van de lever, wat in vitro niet (langdurig) na te bootsen is. Ook immuunreacties in de lever zijn van belang voor effectiviteit en veiligheid van virale transducties, en betreft mogelijk meerdere celtypen in de lever en dit is niet betrouwbaar na te bootsen *in vitro*. Na afloop willen we kijken of er ongewenste veranderingen zijn in genexpressie. Dat is nodig omdat het U1 snRNA een vrij algemene rol speelt in mRNA processing en het tot expressie brengen van een gemodificeerd U1 snRNA dit mogelijk beïnvloedt. Omdat herstel van correcte splicing van FAH en OTC zelf ook al voor een veranderd (genormaliseerd) expressieprofiel kan leiden willen we deze analyse ook in wild-type dieren uitvoeren. Deze analyse vereist isolatie van o.a. leverweefsel en daarmee het doden van het proefdier.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De coderende sequentie voor een aangepast U1 snRNA wordt ingebouwd in AAV-vectoren. Virus wordt geïnjecteerd in muizen, en zal met name de lever transduceren. Kort hierna worden de muizen gechallenged om het fenotype zichtbaar te maken. Voor OTC-deficiënte muizen betekent dit dat ze op een hoog-eiwit dieet geplaatst worden. Voor FAH muizen wordt gestopt met het geven van NTBC in het drinkwater. Gekeken wordt of de ontwikkeling van het (klinische) fenotype minder sterk optreedt in de muizen die een corrigerend U1 snRNA hebben toegediend gekregen. De muizen worden maximaal 6 maanden gevolgd, om ook te kunnen kijken of de tumorvorming minder is. Na afloop worden de muizen geëuthanaseerd en weefsels uitgehaald. Het is verder van belang om te kijken hoe lang effectiviteit aanhoudt, omdat virus niet frequent kan worden toegediend (bij gentherapie meestal eenmalig). AAV DNA integreert niet in het genoom van de mens. Dat maakt het een erg veilig virus, maar houdt in dat door celdeling het virus de cel uit kan raken. Als de lever nog vaak deelt, bijvoorbeeld bij leverbeschadiging of bij jonge patiënten, kan het zijn dat de effectiviteit vermindert. Daarom willen we effectiviteit zowel in een volgroeide lever als een lever met veel celdeling onderzoeken.
Een tweede vraagstelling is of er off-target effecten zijn van de virale toediening van gemodificeerd U1 snRNA. Dit willen we onderzoeken als er effectiviteit van bovenstaand experiment is aangetoond, dus langere overleving en/of lagere ALT/AST (en bij OCT ook ammoniak) waarden t.o.v. de muizen in de groep die wild-type U1 snRNA toegediend heeft gekregen. Na een nog vast te stellen periode (zie verder) worden muizen uit beide groepen geofferd en weefsels verzameld voor analyse met RNA-seq om te onderzoeken of er verschillen zijn in genexpressie tussen beide groepen. Het is noodzakelijk dit in gezonde muizen te doen omdat het herstel van FAH of OTC activiteit zelf al verschillen in genexpressie zal geven (on-target effect) en hiermee off-target effecten onduidelijk zijn. De exacte periode tussen AAV toediening en isolatie van weefsel zal worden bepaald naar aanleiding van de resultaten met OTC en FAH-deficiënte muizen als het snelste moment dat effectiviteit duidelijk was omdat eventuele off-target effecten dan ook hebben kunnen optreden. Gezien de historische ontwikkeling van het fenotype zal dat met grote waarschijnlijkheid 1-3 weken na AAV toediening zijn.

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

De muizen bereiken een volwassen leeftijd onder condities die de presentatie van de ziekte sterk verminderen. Voor OTC deficiëntie is dit een laag-eiwit dieet, voor FAH deficiëntie is dat met NTBC in het drinkwater. Omdat de sequenties voor FAH en OTC anders zijn en muizen met andere genetische achtergrond worden gebruikt worden effecten van injecties met FAH of OTC splice-rescue U1 snRNA onafhankelijk van elkaar onderzocht. De opzet van deze experimenten in de twee modellen is identiek en toegelicht in de figuur in 3.4.3.

Vraagstelling: Is er verbeterde overleving na toediening met splice-rescue U1 snRNA t.o.v. controle (Q1

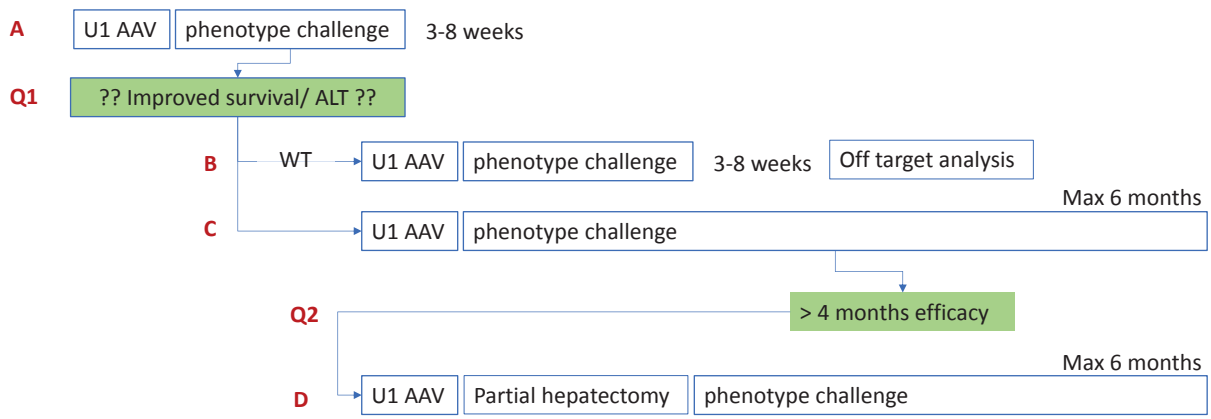
in schema)?
Muizen krijgen hiertoe virus toegediend. Kort na toediening wordt het dieet of drinkwater aangepast zodat de ziekte zich kan ontwikkelen en dit wordt gemonitord met bloedafnames. Eerste dagen en weken worden de muizen frequent gemonitord (exp A). Bij behandeling met AAV zullen waarschijnlijk antilichamen gevormd worden die een volgende toediening met AAV neutraliseren en infectie verhinderen. Patiënten zullen daarom in de toekomst bij voorkeur slechts eenmaal behandeld worden. Daarom is het van belang te onderzoeken of de behandeling langdurig werkzaam blijft en we denken dat het voor deze vraagstelling nodig is om de dieren 6 maanden te monitoren (exp C). Hiertoe zal een maandelijkse bloedafname (kleine volumes) waarschijnlijk voldoende zijn. Na maximaal 6 maanden eindigt het experiment en worden weefsels uitgenomen voor analyse van eiwitexpressie en eventuele orgaanschade.

Vraagstelling: Zijn er off-target effecten van splice-rescue U1 snRNA
In een ander experiment (exp B) wordt de injectie met een werkzaam virus herhaald in wild-type dieren om off-target effecten vast te stellen. De resultaten van dit experiment zullen bijdragen bij het vaststellen van de veiligheid van de strategie.

Vraagstelling: Is splice-rescue U1 snRNA ook langdurig effectief in delende levercellen? Als er aangetoond kan worden dat het virus langdurig (>4 maanden) effectieve bescherming biedt wordt het experiment herhaald (exp D) waarbij kort na injectie met virus en partiele hepatectomie wordt uitgevoerd om celdeling te induceren en een groeiende lever na te bootsen en te toetsen of de behandeling met gemodificeerd U1 snRNA ook in een groeiende lever effectief en veilig is. De uitlees van dit experiment is identiek en de dieren worden 6 maanden gevolgd.

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.

Een schematisch overzicht van de experimenten (A-D) met beslismomenten (Q1 en Q2) in groen weergegeven staat hieronder weergegeven. Er worden verschillende doseringen virus toegediend om te achterhalen wanneer het effectief is en of er verschil in duur van de effectiviteit of in off target effecten is van verschillende doseringen. Zodra er in experiment A een verbetering in het fenotype zichtbaar is in de groep die gemodificeerd U1 snRNA heeft gekregen t.o.v. de controlegroep (Q1) kan worden gestart met 2 experimenten. Bij een toename in overleving van tenminste 15% zullen deze vervolgexperimenten gestart worden. Een hiervan (exp B) dient om eventuele off-target effecten vast te stellen. Hiertoe wordt hetzelfde virus en dosis toegediend aan wild-type dieren. Deze proef dient om te achterhalen of er off-target effecten zijn op gentranscriptie. We willen dit uitvoeren in wild-type dieren omdat hierin de therapeutische effecten (herstel OTC/FAH activiteit) geen rol spelen en alle verschillen per definitie off-target zijn. Een ander experiment (exp C) dient om lange termijn werkzaamheid vast te stellen. Kort na toediening van het virus zal de ontwikkeling van het ziektebeeld (of uitblijven hiervan) regelmatig worden gecontroleerd tot maximaal 6 maanden. Als langdurig (>4 maanden na injectie met AAV) bescherming gedetecteerd wordt (Q2), wordt getest of deze bescherming ook optreedt in levers met veel celdeling. Hiertoe wordt een partiele hepatectomie uitgevoerd (exp D) zodat er meerdere celdelingen nodig zijn om de lever de normale grootte te laten aannemen.



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

3.

Format
Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Op weg naar nieuwe behandelingen voor erfelijke stofwisselingsziekten
1.2	Looptijd van het project	5 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Erfelijke ziekten, innovatieve therapie; gentherapie

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
- ☐ 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)

Patiënten met de erfelijke stofwisselingsziekten Ornithine transcarbamoylase (OTC) en tyrosinemie type 1 missen een enzym dat betrokken is in de stofwisseling. Deze ziekten geven ernstige ziektebeelden. Aan de laatst genoemde ziekte kunnen kinderen zonder goede behandeling vroegtijdig overlijden. De huidige behandeling is beperkt en/of zeer ingrijpend. Doel van het hier voorgestelde project is om een totaal nieuwe strategie te onderzoeken, waarbij het erfelijke defect hersteld kan worden en leidt tot herstel van de ziekte. Het defect wordt veroorzaakt door vertalingsfouten van het DNA naar het enzym dat nodig is voor de stofwisseling. Deze fouten worden “splicedefecten” genoemd. Slechts een deel van het DNA bevat de informatie die nodig is om eiwitten, in dit geval het enzym, te kunnen maken (exonen). Tussen deze exonen ligt DNA met een onduidelijke inhoud

		(intronen). Voor een goede vertaling moeten deze intronen weggehaald worden zodat de exonen naadloos aan elkaar komen. Bij erfelijke mutaties in gebieden dichtbij exon-intron overgangen gaat dit proces vaak mis. Het wordt geschat dat bij ruim 15% van alle erfelijke ziekten een ”splice-defect” de reden is. Het lijkt mogelijk om aangedane cellen in het lichaam te instrueren hoe om te gaan met het erfelijke defect en op een correcte manier de intronen te verwijderen. Onze strategie is om de cel een aangepast eiwit te laten maken dat onderdeel is van dit proces, en dat deze vertalingsfouten kan corrigeren. In het laboratorium kan het “splicingprobleem” met deze strategie opgelost worden. In dit project gaan we de eventuele bij-effecten van deze aanpak, en het herstel van de ziekte onderzoeken.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Wetenschappelijk belang: Tot nu toe hebben we de effectiviteit van de strategie om de genetische fout te herstellen alleen in het laboratorium onderzocht. Dit project zal duidelijk maken of deze strategie ook in een proefdiermodel voor deze ziekten toepasbaar is en/of er nadelige bij-effecten optreden. Maatschappelijk belang: In ruim 15% van alle patiënten met erfelijke mutaties leiden deze specifieke defecten tot het ontwikkelen van de ziekte. Dit onderzoek kan bijdragen in de ontwikkeling van nieuwe therapie voor een deel van deze mensen. In veel gevallen is er momenteel geen enkele therapie beschikbaar.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Muizen; 650
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De therapie zal worden vergeleken met controle dieren die geen therapie krijgen. In deze controles zullen de ziekten OTC of Tyrosinemie zich volledig ontwikkelen waardoor deze controle muizen ziek zullen worden. Omdat deze ziekten zich meestal presenteren bij jonge kinderen met een groeiende lever zal de effectiviteit van de therapie ook worden onderzocht in diermodellen met veel levergroei. Dit wordt veroorzaakt door een operatie waarbij een gedeelte van de lever wordt verwijderd. De lever zal hierdoor gaan groeien. De operatie kan, ondanks pijnstilling, mogelijk pijn en stress veroorzaken.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Muizen die meer dan 20% gewicht verliezen ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht zullen worden geëuthanaseerd. De FAH- (tyrosinemie) of OTC deficiënte muizen die de controle therapie toegediend krijgen, zullen waarschijnlijk allemaal gewicht gaan verliezen als gevolg van leverschade. OTC deficiënte muizen die de therapie krijgen zullen alleen gewicht gaan verliezen als de behandeling niet (meer) werkt en zullen waarschijnlijk minder ongerief ondervinden. In controle dieren zal verder gekeken worden of er nog bij-effecten zijn. Het totale ongerief van de dieren in deze proeven zal niet meer zijn dan matig.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden gedood en weefsels uitgehaald voor verdere analyse.

4 Drie V’s

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het	De methode die de vertalingsfout moet corrigeren wordt in het laboratorium

	gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	geoptimaliseerd met behulp van mini-genen en op gekweekte cellen. Om te onderzoeken of deze strategie ook gebruikt kan worden om de ziekte te behandelen, zijn dierstudies onvermijdelijk, omdat de gentherapie, zoals we dit in de toekomst mogelijk zouden willen uitvoeren in mensen, niet goed na te bootsen is in proefdiervrije modellen, omdat de structuur van de lever en de interactie met het immuunsysteem van belang zijn. Ook de analyse van mogelijke bij-effecten vereisen het gebruik van een intacte lever in een proefdier.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Er is al veel ervaring opgedaan met dit type gentherapie in muizen en met de ontwikkeling van de ziekte in muizen. Met statistiek wordt het minimaal aantal dieren bepaald dat nodig is voor het beantwoorden van de wetenschappelijke vraag. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de techniek die gebruikt gaat worden; er hoeven dus geen extra dieren gebruikt te worden om de techniek verder te ontwikkelen. Experimenten gericht op het bepalen van effectiviteit in een groeiende lever zullen alleen worden uitgevoerd als er bewijs voor effectiviteit is in volwassen 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.	Er wordt gebruik gemaakt van muismodellen die sterk lijken op de ziekte in de mens. De fout in het DNA in muizen met OTC deficiëntie is dezelfde als in mensen met deze ziekte en de exon-intron overgang lijken zeer sterk op elkaar. Behalve dat deze studie zal aantonen dat deze strategie bruikbaar is om een dergelijke fout in het DNA te corrigeren, zal dit deel van de studie ook bijdragen aan de voortgang van deze aanpak naar de klinische toepassing ervan in mensen.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Bij operaties wordt pijnbestrijding gegeven. Er worden humane eindpunten gehanteerd zodat de dieren niet langdurig lijden. Specifiek wordt daarbij o.a. gelet op gewichtsafname en uiterlijke kenmerken van ziekte.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er worden muismodellen gebruikt voor 2 ziektebeelden; tyrosinemie (fumarylacetoacetate hydrolase; FAH-deficiëntie) en OTC deficiëntie. Voor de start van de behandeling worden FAH-deficiënte muizen behandeld met 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl) -1,3-cyclohexanedione (NTBC) NTBC in het drinkwater. Deze stof remt 4-hydroxyfenylpyruvaatdioxygenase, een enzym upstream van FAH, en dit voorkomt de ophoping van toxische metabolieten. OTC-deficiënte muizen worden op een laag-eiwit dieet gehouden wat zorgt dat de ammoniakconcentratie in het bloed normaal blijft. Jong-volwassen muizen worden behandeld met AAV met het aangepaste U1 snRNA dat bij in vitro modellen een verbetering geeft in splicing per ziektebeeld, of AAV met de wild-type U1 snRNA sequentie. Verder zal er een controlegroep met nestgenoten zijn met een werkend FAH en OTC gen, deze hebben geen fenotype. Kort (2-7 dagen) na deze injectie wordt in de FAH groep gestopt met de toediening van NTBC in het drinkwater. In de OTC groep wordt 2-7 dagen na AAV toediening gestart met een hoog-eiwit dieet. Deze veranderingen induceren het fenotype in deficiënte muizen, welke door de behandeling met aangepaste U1 snRNA waarschijnlijk zal verminderen. Primaire uitkomstparameters zijn plasmaconcentraties ammoniak (voor OTC-deficientie) en AST en ALT (voor FAH en OTC-deficientie). Deficiënte muizen met een controlebehandeling zullen lever- en nierschade ontwikkelen en zouden overlijden binnen 6-8 weken. AAV-behandelde muizen zullen maximaal 6 maanden na injectie gedood worden en organen worden verzameld voor analyse van FAH/OTC expressie en histologie geanalyseerd op tekenen van lever- of nierschade. Specifiek voor FAH-deficiëntie wordt gekeken of er een vermindering is van levertumoren, welke vaak voorkomen in deze ziekte, zelfs als er met NTBC wordt behandeld. De vergelijkingsgroep hierbij zijn FAH deficiënte muizen die gedurende het hele experiment op NTBC worden gehouden

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Voor aanvang van het experiment worden muizen die deficiënt zijn voor FAH of OTC respectievelijk behandeld met NTBC in het drinkwater of op een laag-eiwit dieet gehouden om ongerief en orgaanschade te vermijden. De dieren krijgen een eenmalige injectie in de staartvene waarbij virus wordt toegediend. Het toedieningsvolume is conform de richtlijn beschreven in Diehl et al (2001). Enige tijd hierna worden OTC deficiënte dieren op een hoog-eiwit dieet geplaatst en wordt bij de FAH-deficiënte muizen gestopt met de toediening van NTBC (m.u.v. 1 controlegroep). In de eerste maand wordt wekelijks een druppeltje bloed afgenomen, later maandelijks om een beeld te krijgen van effect van deze therapie op het ziektebeloop in de tijd. Maximale duur van het experiment is 6 maanden. Hierna worden de muizen geofferd en bloed en organen uitgenomen. Dit laatste dient om de expressie van OTC en FAH in verschillende weefsels te kunnen analyseren. Ook kan hierdoor de bio-distributie van de AAV vector worden vastgesteld. Zes maanden is lang genoeg om ook een mogelijke vermindering van levertumoren bij FAH deficiëntie te kunnen vaststellen. Als er een in eerste instantie zichtbare verbetering van het fenotype is ten gevolge van de behandeling met gemodificeerd U1 snRNA optreden, maar daarna toch een afname van lichaamsgewicht met >10% zal 1 week NTBC worden toegevoegd in het drinkwater. Eerder is beschreven dat zo'n tijdelijke farmacologische "hulp" daarna kan leiden tot chronische effectiviteit (Yin, Nat Biotech 2014)

Partiele hepatectomie:
Een partiele hepatectomie in volwassen dieren wordt uitgevoerd onder algehele anaesthesie en peri-operatieve pijnbestrijding. De lever groeit snel weer aan, maar dit vereist celdeling. Onderzocht zal worden of het therapeutische effect van de gemodificeerde U1 snRNA vectoren daarna aanhoudt.

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

De experimenten om eventuele off-target effecten van een OTC of FAH splicing-corrigerend U1 snRNA en lange termijn effectiviteit worden getoetst zullen alleen worden uitgevoerd als er effectiviteit is vastgesteld. Er worden alleen U1 snRNA vectoren gebruikt die bij in vitro modellen effectiviteit laten zien.
De poweranalyse is gebaseerd op een vergelijk tussen 2 groepen, waarbij een groep met gemodificeerd U1 snRNA vergeleken wordt met de groep die dezelfde dosis wild-type (controle) U1 snRNA ontvangt.
Er zullen naar verwachting ongeveer 20 dieren per groep nodig zijn. Dit gebaseerd op basis van survival-analyse (http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/) waarbij we aannemen dat de controle dieren een 3.5-voudig hogere hazard ratio hebben en de totale meettijd ruim langer is dan de verwachtte duur waarbij we in de controlegroep events zien (uitval van deze dieren is verwacht na enkele weken).

Voor de analyse van de off-target effecten kan met 6 muizen per groep een verschil van 50% met een s.d. van 30% kan worden waargenomen en kleinere verschillen zullen als niet-relevant worden beschouwd.

B. De dieren

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

Experimenten worden uitgevoerd met geaccepteerde muismodellen voor tyrosinemie en OTC-deficiëntie. Deze lijnen worden gefokt in de eigen dierfaciliteit omdat er speciale behandelingen (NTBC in drinkwater, laag eiwitdieet) vereist zijn om homozygote pups te laten overleven.
Voor OTC deficiëntie worden alleen mannetjes gebruikt, vanwege de X-linked overerving. Voor FAH deficiëntie worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.
Er worden volwassen dieren gebruikt..
Per experiment worden 5 groepen gebruikt, met ~20 dieren per groep.
Deze 5 zijn: i) OTC/FAH intacte dieren, ii) FAH or OTC deficiënt met lage dosis controle AAV, iii) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis AAV, iv) FAH of OTC deficiënt met lage dosis rescue U1 snRNA AAV, v) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis rescue U1 snRNA AAV. Om een mogelijke vermindering van de vorming van levertumoren te bepalen wordt er bij de FAH deficiënte groep een extra groep gebruikt die continue op NTBC wordt gehouden.
Off-target effecten worden in wild-type dieren uitgevoerd. Deze worden verkregen als de FAH/OTC positieve littermates uit de eigen fok. Hierbij worden 2 groepen vergeleken, behandeld met wild-type U1 snRNA of gemodificeerd U1 snRNA, met een enkele (effectieve) dosis. Voor het FAH project komt dit totaal op:
Exp A+ D: elk 5 groepen * 20 dieren (samen 200)

Exp B (off target analyse groepen): 2 groepen van 6 muizen (samen 12)
Exp C (lange termijn effect): 6 groepen * 20 muizen (samen 120). Voor FAH komt dit op ~332
Voor OTC betreft het een groep minder in exp C, dus ~312. Totaal geschat op zo'n 650 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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: De dierproeven zijn essentieel vanwege de interactie van immuunsysteem en lever, en de specifieke effecten de complexe structuur van de lever op transductie met AAV. Alle optimalisatie van effectiviteit van het gemodificeerde U1 snRNA wordt uitgevoerd met behulp van minigenen en celkweek. Om de therapeutische effectiviteit te onderzoeken zijn dierstudies daarom onvermijdelijk, en hetzelfde geldt voor analyse van off-target effecten in dezelfde setting.
Verfijning: De mate van ongerief wordt beperkt doordat de gebruikte OTC deficientie muizen pas na een dieet ziekteverschijnselen laten zien en op een laag-eiwit dieet geen fenotype hebben. FAH muizen krijgen NTBC wat het ongerief verhindert. De dieren worden frequent gemonitord via bloed parameters om ongerief vroeg te detecteren en hiermee beperkt wordt. Ongerief na de gedeeltelijke hepatectomie wordt beperkt door peri-operatief gebruik van pijnstilling. Er wordt gebruik gemaakt van muismodellen die de ziekte in de mens zoveel mogelijk benaderen. De mutatie in OTC deficiëntie is dezelfde als in mensen en de sequenties van de exon-intron overgang lijken zeer sterk op elkaar. Behalve proof-of-concept zal dit deel van de studie hiermee ook bijdragen aan de translatie van deze strategie naar een klinische trial in mensen.
Vermindering: Er is al veel ervaring opgedaan met AAV in muizen en met de ontwikkeling van de ziekten FAH en OTC in deze diermodellen.,. Voor OTC deficiëntie gebruiken we alleen mannetjes, omdat het gen op het X-chromosoom ligt bij muis en mens en de patiëntpopulatie met name mannen omvat vanwege deze X-linked overerving. Experimenten gericht op het bepalen van effectiviteit in een groeiende lever zullen alleen worden uitgevoerd als er bewijs voor effectiviteit is in volwassen muizen.

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 FAH-deficiente muizen worden pas van NTBC bevattend drinkwater afgehaald na aanvang van de behandeling. In deze aanloop is er geen fenotype. In een gunstig scenario, waarbij de effectiviteit voldoende is om de toxiciteit geassocieerd met FAH-deficiëntie te voorkomen, zullen de behandelde dieren zeer beperkt ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor OTC-deficiente muizen, die pas gechallenged worden met een hoog-eiwit dieet nadat de therapie gestart is.
Afname van de kleine volumina bloed die voor dit project al voldoende zijn zal zonder anaesthesie worden uitgevoerd, evenals de injectie van virus in de staartvene. Bij het offeren ven bij de hepatectomie zullen dieren onder algehele anaesthesie worden gebracht. Bij operaties wordt pijnbestrijding toegepast. Alle experimenten met de AAV vectoren worden uitgevoerd in overeenstemming met geldende regels voor inperking, op DMII safety level. Alle samples van deze studie worden geanalyseerd op MLII inperkingsniveau tot ze gefixeerd zijn en virus daarmee volledig geinactiveerd is.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Bij de muizen die hepatectomie ondergaan wordt pijnstilling toegepast tijdens en na de operatie ~~middels een eenmalige subcutane injectie met buprenorfine~~.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Muizen ondervinden bij deze experimenten ongerief ten gevolge van de IV injecties en bloedafnames (beide ingeschat als gering). Een deel ondergaat hepatectomie onder anaesthesie met matig ongerief welke wordt verminderd door pijnbestrijding na de operatie. Er zijn verder ziekteverschijnselen tgv genetische modificatie: FAH- of OTC deficiente muizen kunnen leverschade krijgen en daarmee geassocieerd gewichtsverlies. Omdat hiervoor een humaan eindpunt wordt gehanteerd is het ongerief beperkt. In FAH-deficiënte muizen kunnen op heel lange termijn levertumoren ontwikkelen die mogelijk ongerief geven, maar dit is niet voorzien in deze experimenten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Gewichtsverlies in FAH/OTC deficiënte muizen is een gevolg van ophoping van toxische metabolieten die tot

leverschade leiden. De oorzaak van levertumoren in FAH-deficiëntie is onbekend.

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

Muizen worden voor aanvang van de behandeling in condities gehouden waar er geen fenotype ontwikkelt. Tijdens het experiment worden geen additionele maatregelen genomen om leverschade te voorkomen, omdat het doel is om te onderzoeken of nieuwe therapie beter werkt dan controle-behandeling. Het ongerief ten gevolge van de leverschade wordt beperkt door de humane eindpunten mbt gewichtsverlies en het monitoren van bloedwaarden.

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.

Muizen die meer dan 20% gewicht verliezen ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht zullen worden geëuthanaseerd evenals dieren die tekenen van algehele malaise (zoals bolle rug, pilo-erectie, inactiviteit) vertonen.

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

De FAH- of OTC deficiënte muizen die het controle of gemodificeerd U1 snRNA toegediend krijgen lopen allemaal kans gewicht gaan verliezen als gevolg van leverschade. De controles krijgen het allemaal en degene met gemodificeerd snRNA alleen als de behandeling niet (meer) werkt.

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.

Controles zullen matig ondervinden; dieren behandeld met gemodificeerd U1 snRNA hebben licht tot matig ongerief afhankelijk van de effectiviteit. De dieren die voor off-target analyse worden gebruikt hebben waarschijnlijk licht ongerief, alleen bij onverwachte off-target effecten is het ongerief maximaal 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.

Voor het beantwoorden van de vraagstelling moet lever- en niermateriaal microscopisch onderzocht worden

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

Centrale Commissie Dierproeven

5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam
[redacted]
Meibergdreef [redacted]
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016775

Bijlagen
2

Datum 17 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 augustus 2017. Het gaat om uw project "RescU1 Splicing". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002016775. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
17 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016775

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016775

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11800
Naam instelling of organisatie:	Academic Medical Center Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	343362777
Straat en huisnummer:	Meibergdreef [redacted]
Postcode en plaats:	1105 AZ AMSTERDAM
IBAN:	NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]/Onderzoeker
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Datum:
17 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180002016775

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2017
Geplande einddatum:	30 november 2021
Titel project:	RescU1 Splicing
Titel niet-technische samenvatting:	Corretie van splicingsdeften bij erfelijke ziekten
Naam DEC:	DEC AMC
Postadres DEC:	Meibergdreef [redacted]
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	17 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016775

Bijlagen
2

Datum 17 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 17 augustus 2017
Vervaldatum: 16 september 2017
Factuurnummer: 170775
Ordernummer: Kostenplaatsnummer [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002016775	€ 1035,00

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

6.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project RescU1 Splicing

3. Titel van de NTS Op weg naar nieuwe behandelingen voor erfelijke stofwisselingsziekten

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken 6 april 2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager nvt
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
   >ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/ een wijziging op een bestaande vergunning~~.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
   >ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
   >nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het onderzoeken of gemodificeerde U1 snRNAs veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief splice-defecten kunnen verhelpen) en kan getypeerd worden als een project met 3 subdoelen. De subdoelen zijn:
A) Het bepalen van de effectiviteit om een genetisch splitsingsdefect te corrigeren met snRNA met behulp van een adeno-achtig virus in een model voor tyrosinemie en

OTC deficiëntie, die beiden gebaseerd zijn op een mutatie die leidt tot een splitsingseffect;
B) Het bepalen van off-target effecten;
C) Het bepalen van lange termijn effecten ook in delende levercellen (ontwikkeling van levertumoren).

De subdoelen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Eerst zal subdoel A behaald worden voordat subvraag B en C beantwoord zullen worden. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van deze onderzoekers met de beide modellen en de ervaring met gentherapie binnen de onderzoeksgroep.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
   >nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar het veilig (d.w.z. zonder ongewenste veranderingen in het transcriptoom) tot expressie brengen in de lever van gemodificeerde U1s snRNA en of dit effectief een genetisch splitsingsdefect kan verhelpen. Er wordt ook translationeel onderzoek gedaan naar verbetering van de behandeling van twee specifieke stofwisselingsziekten die veroorzaakt worden door een mutatie die leidt tot een genetisch splitsingsdefect (het niet goed scheiden van de exonen van de intronen binnen het pre-mRNA).

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.
   Het directe doel (het onderzoeken of gemodificeerde U1 snRNAs veilig in de lever tot expressie gebracht kunnen worden en effectief genetische splitsingsdefecten kunnen verhelpen) heeft een directe en reële relatie met uiteindelijke doel (het verbeteren van de behandelmethoden voor OTC en FAH deficiëntie en mogelijk voor andere erfelijke stofwisselingsaandoeningen die veroorzaakt worden door andere genetische splitsingdefecten). Al zal de toepassing van deze behandelmethode in de verre toekomst liggen en niet binnen dit project gehaald worden, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het corrigeren van een genetisch splitsingsdefect met behulp van gentherapie, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten met OTC of FAH deficiëntie.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

   Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag. Alle experimenten met de AAV vectoren zullen worden uitgevoerd in overeenstemming met geldende regels voor inperking, op DMII veiligheidsniveau. Alle samples van deze studie zullen worden geanalyseerd op MLII inperkingsniveau tot ze gefixeerd zijn en het virus daarmee volledig geïnactiveerd is.

   Proefopzet en haalbaarheid

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

   De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.
   De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met virale injectie in proefdieren en hepatectomie. Ze hebben ervaring met het FAH model en goede samenwerkingen met wereldwijde experts op gebied van FAH en OCT deficiëntie.

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

   Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. Er worden twee modellen gebruikt voor het onderzoeken van deze gentherapie strategie. In de eerste experimenten wordt onderzocht of de gentherapie de leverschade kan uitstellen of zelfs voorkomen in de beide ziektenmodellen. Het gebruik van twee ziektenmodellen vindt de DEC gerechtvaardigd omdat naast het effect van de therapie in twee relevante ziektenmodellen, dit ook bijdraagt aan de uiteindelijke doelstelling. Het aantonen dat deze strategie effectief is in twee verschillende ziektemodellen, die wel gebaseerd zijn op een soortgelijk defect, zullen namelijk bijdragen aan de inschatting van de bruikbaarheid van deze gentherapiestrategie voor gensplitsingsdefecten. Er zijn ook GO/No GO momenten geformuleerd. Pas als er verbetering optreedt (>15%) in de veroorzaakte leverschade zullen de lange termijneffecten en ongewenste bijeffecten onderzocht worden. Ook zal het effect van sneldelende levercellen pas onderzocht worden, als duidelijk is dat de strategie met gentherapie werkt.

   Welzijn dieren

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

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

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

    Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*.

    Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Het ongerief is ingeschat als maximaal matig. De dieren waarbij leverschade optreedt, wat gecontroleerd zal worden door gewichtsverlies te meten en bloedwaardes in het bloed te bepalen, zullen matig ongerief ondergaan. In dieren waarbij de gentherapie zal werken zal ongerief beperkt kunnen blijven tot licht.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).*

    De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Er is wel sprake van genetische modificatie van de betreffende mutatie in de lever. De doelstelling is echter dat dit het ziektebeeld zal verminderen.

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

    Het humane eindpunt is gedefinieerd als een gewichtsverlies van meer dan 20% lichaamsgewicht ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht. Er is geen percentage geschat omdat het humane eindpunt ook het experimentele eindpunt van de studie is. De leverschade wordt gemeten door het bloed te monitoren op ammoniak verbindingen en het lichaamsgewicht te volgen. Zodra dieren meer dan 20% gewichtsverlies hebben, worden ze opgeofferd voor analyse. In principe kunnen alle dieren dus het HEP bereiken, behalve de controle dieren die beschermd worden tegen het ontwikkelen van leverschade door NTBC en in het geval dat de gentherapie effectief blijkt te zijn. De dieren worden beschermd tegen onverwacht ongerief doordat, naast het gewichtsverlies van 20%, ook tekenen van algehele malaise zijn opgenomen in het humane eindpunt.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
De aanvrager gebruikt vervangingsalternatieven waar mogelijk. De optimalisatie van de effectiviteit van het gemodificeerd U1 snRNA wordt in-vitro uitgevoerd met mini-genen. Het uiteindelijk testen van de therapie in de lever waar de aandoening tot uiting komt moet in een proefdier onderzocht worden omdat dan onderzocht kan worden of de vector daadwerkelijk de lever bereikt, het orgaan waar de correctie nodig is, en wat de verdere consequenties zijn met betrekking tot het voorkomen/remmen van het ziektebeeld.

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

    Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor een "survival" analyse (genoemd onder A in bijlage I). Voor de off-target analyse is het aantal dieren lager ingeschat op basis van de powerberekening. Daarnaast voorkomt het Go/No Go moment na de eerste onderzoeksvraag (verbetering in overleving zonder leverschade) ervoor dat er geen dieren onnodig gebruikt zullen worden. (N.B.: De term survivalanalyse geeft wellicht een verkeerd beeld: de dieren worden getermineerd op het moment dat ze meer dan 20% gewichtsverlies hebben.)

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:
1) de leverschade pas tot uiting komt (dieetinterventie) als de dieren volwassen zijn en de proef daadwerkelijk start;
2) de dieren naast gewichtsverlies ook gecontroleerd worden op de bloedwaarden. Hierdoor kunnen de dieren die leverschade ontwikkelen vroeg gedetecteerd worden en beter in de gaten gehouden worden;
3) er wordt pijnbestrijding toegepast na de gedeeltelijke leververwijdering;
4) er is veel ervaring met deze modellen waardoor ongerief kan worden voorkomen.
Het humane eindpunt is daarnaast duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *(Zie Praktische handreiking*

ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).
Er wordt in dit onderzoek gelijk gebruik gemaakt van mannelijke en vrouwelijke dieren in het FAH model. Het OTC model wordt alleen in mannetjes verricht omdat de afwijking zich bevindt op het geslachtschromosoom X. In mensen hebben daarom vooral jongens deze afwijking. De DEC vindt de keus om dit model alleen in mannelijke dieren te onderzoeken daarom gerechtvaardigd.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).*

    De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood om de lever- en nierschade te analyseren.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
    nvt

    NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
    Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid. De NTS is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).*
Rechtvaardigt het onderzoeken van de effectiviteit van het tot expressie laten komen van gemodificeerd U1 snRNA (door middel van een virale vector) om een genetisch splitsingsdefect te verhelpen en daardoor het verminderen van de leverschade ten gevolge van dit defect in twee verschillende stofwisselingsziekten, het maximaal matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het onderzoeken van de bruikbaarheid van een specifieke gentherapie (het tot expressie brengen van gemodificeerd U1 snRNA) in het effectief verhelpen van een genetisch splitsingsdefect en het onderzoeken of deze strategie effectief is om het

optreden van lever- en nierschade te kunnen verhinderen in twee onafhankelijke ziektenmodellen, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de patiënten met een tyrosinemie (FAH) of Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie. Er is momenteel een behandeling die bestaat uit een zeer ingrijpend dieet en medicatie. Er is echter dringend behoefte aan een betere behandelingsmethode.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat een groot gedeelte lever- en nierschade zal ontwikkelen en hierdoor mogelijk stress en pijn zullen ondervinden.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en mogelijke patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan een betere behandeling van genetische splitsingsdefecten en met name voor FAH of OTC deficiënties. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 650 muizen maximaal matig ongerief ondergaat, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de bruikbaarheid van een dergelijke gentherapie strategie. Hierdoor kan de behandeling van genetische splitsingsdefecten mogelijk verbeterd worden. De toepassing van deze inzichten zal echter nog jaren duren en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over het verhelpen van een genetische splitsingsdefect door middel van het tot expressie laten komen van een gemodificeerd U1 snRNA door middel van een virale vector, en het translationele onderzoek naar de therapeutische potentie van deze gentherapie strategie voor het verhelpen van tyrosinemie (FAH) of Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het maximaal matige ongerief van maximaal 650 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Op weg naar nieuwe behandelingen voor erfelijke stofwisselingsziekten

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de strategie om een genetisch splitsingsdefect met gentherapie (expressie van gemodificeerd U1 snRNA door middel van een virale vector) te verhelpen en het onderzoeken van het effect van deze therapie in twee ziektenmodellen voor verschillende stofwisselingsziekten, het matige ongerief van de 650 muizen die maximaal matig ongerief zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In dit onderzoek zal een nieuwe behandelingsstrategie voor een genetisch splitsingsdefect ontwikkeld worden. Deze strategie wordt onderzocht in twee muismodellen waarbij een soortgelijke mutatie als in mensen, leidt tot een genetisch splitsingsdefect en waarin het fenotype goed gekarakteriseerd is. De muizen ontwikkelen op een eiwitrijk dieet lever- en ook nierschade. De remming van het ontwikkelen van lever- en nierschade wordt de belangrijkst uitleesparameter. De uitkomsten van dit onderzoek zullen bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van een betere behandeling van stofwisselingsziekten zoals tyrosinemie (FAH) of Ornithine transcarbamoylase (OTC) deficiëntie. Dit zijn ernstige ziekten waarvan de symptomen onderdrukt worden door een zeer ingrijpend dieet met aanvullende medicatie. De behandeling is levenslang nodig en is niet altijd voldoende om het ziektebeeld te voorkomen. De DEC onderschrijft de noodzaak voor een betere behandeling van deze ziekten.

Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het matige ongerief dat de muizen ondergaan, wordt veroorzaakt door het ontwikkelen van lever- en nierschade. De DEC erkent dat deze modellen, geschikte modellen zijn om de bruikbaarheid van deze strategie te onderzoeken. De eerste onderzoeksvraag betreft de effectiviteit van deze therapie om de leverschade te verhinderen. Hier is een duidelijk Go/No Go moment beschreven. Bij een verbetering in de overleving met meer dan 15% zullen de vervolgvragen die verder ingaan op ongewenste bijeffecten en de lange termijn effecten op het ontwikkelen van levertumoren onderzocht worden. Deze Go/No Go stap borgt dat de vervolgvragen in een geschikte experimentele conditie worden uitgevoerd en voorkomt onnodig proefdiergebruik indien de therapie niet effectief zou blijken te zijn. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De onderzoekers hebben proefdiervrije alternatieven gebruikt waar mogelijk, zoals mini-genen voor het optimaliseren van de gemodificeerde U1snRNA. De DEC is van mening dat deze vraagstellingen in dit projectvoorstel alleen in proefdieren onderzocht kan worden. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de bloedwaarden van de dieren regelmatig gecontroleerd worden en zo vroege leverschade geïdentificeerd kan worden. Hierdoor kunnen deze muizen beter in de gaten gehouden worden om ongerief te voorkomen. De HEP is duidelijk omschreven en beschermt de dieren tegen het ontwikkelen van ernstig ongerief.

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

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
      ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
      ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
      ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Er zijn geen knelpunten of dilemma’s naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat

gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten...., een acceptabel alternatief is, omdat....."

C12. Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

C18. Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder

wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft."

Voorbeeld B: "Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan."

D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): "De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt."

E. Advies

E2. Voorbeeld: "Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn....."

7.

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 13 september 2017 10:06
Aan: [redacted]
CC: 'projectaanvraag'; [redacted]
Onderwerp: RE: OntvangstBevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven avd118002016775

Geachte [redacted],

Op 16 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD118002016775. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

U heeft niet inzichtelijk gemaakt hoeveel dieren licht en hoeveel dieren matig ongerief ondergaan. Ook is niet duidelijk hoeveel dieren naar verwachting een humaan eindpunt zullen bereiken. U wordt verzocht zowel de aanvraag als de NTS op deze punten aan te passen.

Opsturen binnen veertien dagen
De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 14 september. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

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

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven **www.centralecommissiedierproeven.nl**

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

8.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er worden muismodellen gebruikt voor 2 ziektebeelden; tyrosinemie (fumarylacetoacetate hydrolase; FAH-deficiëntie) en OTC deficiëntie. Voor de start van de behandeling worden FAH-deficiënte muizen behandeld met 2-(2-Nitro-4-trifluoromethylbenzoyl) -1,3-cyclohexanedione (NTBC) NTBC in het drinkwater. Deze stof remt 4-hydroxyfenylpyruvaatdioxygenase, een enzym upstream van FAH, en dit voorkomt de ophoping van toxische metabolieten. OTC-deficiënte muizen worden op een laag-eiwit dieet gehouden wat zorgt dat de ammoniakconcentratie in het bloed normaal blijft. Jong-volwassen muizen worden behandeld met AAV met het aangepaste U1 snRNA dat bij in vitro modellen een verbetering geeft in splicing per ziektebeeld, of AAV met de wild-type U1 snRNA sequentie. Verder zal er een controlegroep met nestgenoten zijn met een werkend FAH en OTC gen, deze hebben geen fenotype. Kort (2-7 dagen) na deze injectie wordt in de FAH groep gestopt met de toediening van NTBC in het drinkwater. In de OTC groep wordt 2-7 dagen na AAV toediening gestart met een hoog-eiwit dieet. Deze veranderingen induceren het fenotype in deficiënte muizen, welke door de behandeling met aangepaste U1 snRNA waarschijnlijk zal verminderen. Primaire uitkomstparameters zijn plasmaconcentraties ammoniak (voor OTC-deficientie) en AST en ALT (voor FAH en OTC-deficientie). Deficiënte muizen met een controlebehandeling zullen lever- en nierschade ontwikkelen en zouden overlijden binnen 6-8 weken. AAV-behandelde muizen zullen maximaal 6 maanden na injectie gedood worden en organen worden verzameld voor analyse van FAH/OTC expressie en histologie geanalyseerd op tekenen van lever- of nierschade. Specifiek voor FAH-deficiëntie wordt gekeken of er een vermindering is van levertumoren, welke vaak voorkomen in deze ziekte, zelfs als er met NTBC wordt behandeld. De vergelijkingsgroep hierbij zijn FAH deficiënte muizen die gedurende het hele experiment op NTBC worden gehouden

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Voor aanvang van het experiment worden muizen die deficiënt zijn voor FAH of OTC respectievelijk behandeld met NTBC in het drinkwater of op een laag-eiwit dieet gehouden om ongerief en orgaanschade te vermijden. De dieren krijgen een eenmalige injectie in de staartvene waarbij virus wordt toegediend. Het toedieningsvolume is conform de richtlijn beschreven in Diehl et al (2001). Enige tijd hierna worden OTC deficiënte dieren op een hoog-eiwit dieet geplaatst en wordt bij de FAH-deficiënte muizen gestopt met de toediening van NTBC (m.u.v. 1 controlegroep). In de eerste maand wordt wekelijks een druppeltje bloed afgenomen, later maandelijks om een beeld te krijgen van effect van deze therapie op het ziektebeloop in de tijd. Maximale duur van het experiment is 6 maanden. Hierna worden de muizen geofferd en bloed en organen uitgenomen. Dit laatste dient om de expressie van OTC en FAH in verschillende weefsels te kunnen analyseren. Ook kan hierdoor de bio-distributie van de AAV vector worden vastgesteld. Zes maanden is lang genoeg om ook een mogelijke vermindering van levertumoren bij FAH deficiëntie te kunnen vaststellen. Als er een in eerste instantie zichtbare verbetering van het fenotype is ten gevolge van de behandeling met gemodificeerd U1 snRNA optreden, maar daarna toch een afname van lichaamsgewicht met >10% zal 1 week NTBC worden toegevoegd in het drinkwater. Eerder is beschreven dat zo'n tijdelijke farmacologische "hulp" daarna kan leiden tot chronische effectiviteit (Yin, Nat Biotech 2014)

Partiele hepatectomie:
Een partiele hepatectomie in volwassen dieren wordt uitgevoerd onder algehele anaesthesie en peri-operatieve pijnbestrijding. De lever groeit snel weer aan, maar dit vereist celdeling. Onderzocht zal worden of het therapeutische effect van de gemodificeerde U1 snRNA vectoren daarna aanhoudt.

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

De experimenten om eventuele off-target effecten van een OTC of FAH splicing-corrigerend U1 snRNA en lange termijn effectiviteit worden getoetst zullen alleen worden uitgevoerd als er effectiviteit is vastgesteld. Er worden alleen U1 snRNA vectoren gebruikt die bij in vitro modellen effectiviteit laten zien.
De poweranalyse is gebaseerd op een vergelijk tussen 2 groepen, waarbij een groep met gemodificeerd U1 snRNA vergeleken wordt met de groep die dezelfde dosis wild-type (controle) U1 snRNA ontvangt.
Er zullen naar verwachting ongeveer 20 dieren per groep nodig zijn. Dit gebaseerd op basis van survival-analyse (http://www.sample-size.net/sample-size-survival-analysis/) waarbij we aannemen dat de controle dieren een 3.5-voudig hogere hazard ratio hebben en de totale meettijd ruim langer is dan de verwachtte duur waarbij we in de controlegroep events zien (uitval van deze dieren is verwacht na enkele weken).

Voor de analyse van de off-target effecten kan met 6 muizen per groep een verschil van 50% met een s.d. van 30% kan worden waargenomen en kleinere verschillen zullen als niet-relevant worden beschouwd.

B. De dieren

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

Experimenten worden uitgevoerd met geaccepteerde muismodellen voor tyrosinemie en OTC-deficiëntie. Deze lijnen worden gefokt in de eigen dierfaciliteit omdat er speciale behandelingen (NTBC in drinkwater, laag eiwitdieet) vereist zijn om homozygote pups te laten overleven.
Voor OTC deficiëntie worden alleen mannetjes gebruikt, vanwege de X-linked overerving. Voor FAH deficiëntie worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.
Er worden volwassen dieren gebruikt..
Per experiment worden 5 groepen gebruikt, met ~20 dieren per groep.
Deze 5 zijn: i) OTC/FAH intacte dieren, ii) FAH or OTC deficiënt met lage dosis controle AAV, iii) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis AAV, iv) FAH of OTC deficiënt met lage dosis rescue U1 snRNA AAV, v) FAH of OTC deficiënt met hoge dosis rescue U1 snRNA AAV. Om een mogelijke vermindering van de vorming van levertumoren te bepalen wordt er bij de FAH deficiënte groep een extra groep gebruikt die continue op NTBC wordt gehouden.
Off-target effecten worden in wild-type dieren uitgevoerd. Deze worden verkregen als de FAH/OTC positieve littermates uit de eigen fok. Hierbij worden 2 groepen vergeleken, behandeld met wild-type U1 snRNA of gemodificeerd U1 snRNA, met een enkele (effectieve) dosis. Voor het FAH project komt dit totaal op:
Exp A+ D: elk 5 groepen * 20 dieren (samen 200)

Exp B (off target analyse groepen): 2 groepen van 6 muizen (samen 12)
Exp C (lange termijn effect): 6 groepen * 20 muizen (samen 120). Voor FAH komt dit op ~332
Voor OTC betreft het een groep minder in exp C, dus ~312. Totaal geschat op zo'n 650 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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging: De dierproeven zijn essentieel vanwege de interactie van immuunsysteem en lever, en de specifieke effecten de complexe structuur van de lever op transductie met AAV. Alle optimalisatie van effectiviteit van het gemodificeerde U1 snRNA wordt uitgevoerd met behulp van minigenen en celkweek. Om de therapeutische effectiviteit te onderzoeken zijn dierstudies daarom onvermijdelijk, en hetzelfde geldt voor analyse van off-target effecten in dezelfde setting.
Verfijning: De mate van ongerief wordt beperkt doordat de gebruikte OTC deficientie muizen pas na een dieet ziekteverschijnselen laten zien en op een laag-eiwit dieet geen fenotype hebben. FAH muizen krijgen NTBC wat het ongerief verhindert. De dieren worden frequent gemonitord via bloed parameters om ongerief vroeg te detecteren en hiermee beperkt wordt. Ongerief na de gedeeltelijke hepatectomie wordt beperkt door peri-operatief gebruik van pijnstilling. Er wordt gebruik gemaakt van muismodellen die de ziekte in de mens zoveel mogelijk benaderen. De mutatie in OTC deficiëntie is dezelfde als in mensen en de sequenties van de exon-intron overgang lijken zeer sterk op elkaar. Behalve proof-of-concept zal dit deel van de studie hiermee ook bijdragen aan de translatie van deze strategie naar een klinische trial in mensen.
Vermindering: Er is al veel ervaring opgedaan met AAV in muizen en met de ontwikkeling van de ziekten FAH en OTC in deze diermodellen.,. Voor OTC deficiëntie gebruiken we alleen mannetjes, omdat het gen op het X-chromosoom ligt bij muis en mens en de patiëntpopulatie met name mannen omvat vanwege deze X-linked overerving. Experimenten gericht op het bepalen van effectiviteit in een groeiende lever zullen alleen worden uitgevoerd als er bewijs voor effectiviteit is in volwassen muizen.

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 FAH-deficiente muizen worden pas van NTBC bevattend drinkwater afgehaald na aanvang van de behandeling. In deze aanloop is er geen fenotype. In een gunstig scenario, waarbij de effectiviteit voldoende is om de toxiciteit geassocieerd met FAH-deficiëntie te voorkomen, zullen de behandelde dieren zeer beperkt ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor OTC-deficiente muizen, die pas gechallenged worden met een hoog-eiwit dieet nadat de therapie gestart is.
Afname van de kleine volumina bloed die voor dit project al voldoende zijn zal zonder anaesthesie worden uitgevoerd, evenals de injectie van virus in de staartvene. Bij het offeren ~~v~~en bij de hepatectomie zullen dieren onder algehele anaesthesie worden gebracht. Bij operaties wordt pijnbestrijding toegepast. Alle experimenten met de AAV vectoren worden uitgevoerd in overeenstemming met geldende regels voor inperking, op DMII safety level. Alle samples van deze studie worden geanalyseerd op MLII inperkingsniveau tot ze gefixeerd zijn en virus daarmee volledig geinactiveerd is.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Bij de muizen die hepatectomie ondergaan wordt pijnstilling toegepast tijdens en na de operatie

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Muizen ondervinden bij deze experimenten ongerief ten gevolge van de IV injecties en bloedafnames (beide ingeschat als gering). Een deel ondergaat hepatectomie onder anaesthesie met matig ongerief welke wordt verminderd door pijnbestrijding na de operatie. Er zijn verder ziekteverschijnselen tgv genetische modificatie: FAH- of OTC deficiente muizen kunnen leverschade krijgen en daarmee geassocieerd gewichtsverlies. Omdat hiervoor een humaan eindpunt wordt gehanteerd is het ongerief beperkt. In FAH-deficiënte muizen kunnen op heel lange termijn levertumoren ontwikkelen die mogelijk ongerief geven, maar dit is niet voorzien in deze experimenten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Gewichtsverlies in FAH/OTC deficiënte muizen is een gevolg van ophoping van toxische metabolieten die tot leverschade leiden. De oorzaak van levertumoren in FAH-deficiëntie is onbekend.

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

Muizen worden voor aanvang van de behandeling in condities gehouden waar er geen fenotype ontwikkelt. Tijdens het experiment worden geen additionele maatregelen genomen om leverschade te voorkomen, omdat het doel is om te onderzoeken of nieuwe therapie beter werkt dan controle-behandeling. Het ongerief ten gevolge van de leverschade wordt beperkt door de humane eindpunten mbt gewichtsverlies en het monitoren van bloedwaarden.

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.

Muizen die meer dan 20% gewicht verliezen ten opzichte van het maximaal bereikte gewicht zullen worden geëuthanaseerd evenals dieren die tekenen van algehele malaise (zoals bolle rug, pilo-erectie, inactiviteit) vertonen.

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

De FAH- of OTC deficiënte muizen die het controle of gemodificeerd U1 snRNA toegediend krijgen lopen allemaal kans gewicht gaan verliezen als gevolg van leverschade. De deficiënte controles krijgen het allemaal (maximaal 240 dieren) en degene met gemodificeerd snRNA alleen als de behandeling niet (meer) werkt (ook 240 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.

Experiment	Gen	Groep	Aantal	ongerief (max)
A	FAH	niet-deficient	20	licht
	FAH	low control	20	matig
	FAH	high control	20	matig
	FAH	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	FAH	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
A	OTC	niet-deficient	20	licht
	OTC	low control	20	matig
	OTC	high control	20	matig
	OTC	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	OTC	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
B	WT	controle AAV	12	matig door onverwachte off-target effecten
B	WT	Mod U1	12	matig door onverwachte off-target effecten
C	FAH	niet-deficient	20	licht
	FAH	low control	20	matig
	FAH	high control	20	matig
	FAH	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	FAH	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	FAH	NTBC	20	licht
C	OTC	niet-deficient	20	licht

	OTC	low control	20	matig
	OTC	high control	20	matig
	OTC	low modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit
	OTC	high modU1	20	licht/matig; afhankelijk van effectiviteit

D	FAH	niet-deficient	20	matig
	FAH	low control	20	matig
	FAH	high control	20	matig
	FAH	low modU1	20	matig
	FAH	high modU1	20	matig
D	OTC	niet-deficient	20	matig
	OTC	low control	20	matig
	OTC	high control	20	matig
	OTC	low modU1	20	matig
	OTC	high modU1	20	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.

Voor het beantwoorden van de vraagstelling moet lever- en niermateriaal microscopisch onderzocht worden

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

9.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam
[redacted]
Meibergdreef [redacted]
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002016775
Bijlagen
1

Datum 28 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 16 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "RescU1 Splicing" met aanvraagnummer AVD118002016775. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben uw vragen gesteld over het ongerief en de humane eindpunten. U heeft als reactie een aangepaste bijlage dierproeven en een aangepaste NTS ingediend. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "RescU1 Splicing" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2017 tot en met 30 november 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over,

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

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Academic Medical Center Amsterdam
Adres:	Meibergdreef 31
Postcode en plaats:	1105 AZ AMSTERDAM
Deelnemersnummer:	11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2017 tot en met 30 november 2021, voor het project "RescU1 Splicing" met aanvraagnummer AVD118002016775, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 augustus 2017, ontvangen op 16 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 26 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Injectie met AAV onder een aangepast dieet gevolgd door bloedafname en weefseluitname				
	Muizen (Mus musculus) /	650	86% Matig 14% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt

anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Aanvraagnummer:
AVD118002016775

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.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11600
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum	
KvK-nummer	27366422	
Straat en huisnummer	Albinusdreef	2
Postbus	9600	
Postcode en plaats	2300 RC	Leiden
IBAN	NL11DEUT0451001400	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC	

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]	☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

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

(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie		
Afdeling		
Telefoonnummer		
E-mailadres		

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ 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 - 01 - 2018
		Einddatum	31 - 12 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	Secretariaat DEC LUMC
		Postadres	[redacted] Postbus 9600 2300 RC Leiden
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,- Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	Leiden
Datum	6 - 6 - 2017
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11600
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	LUMC
1.3	Vul de titel van het project in.	Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.

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

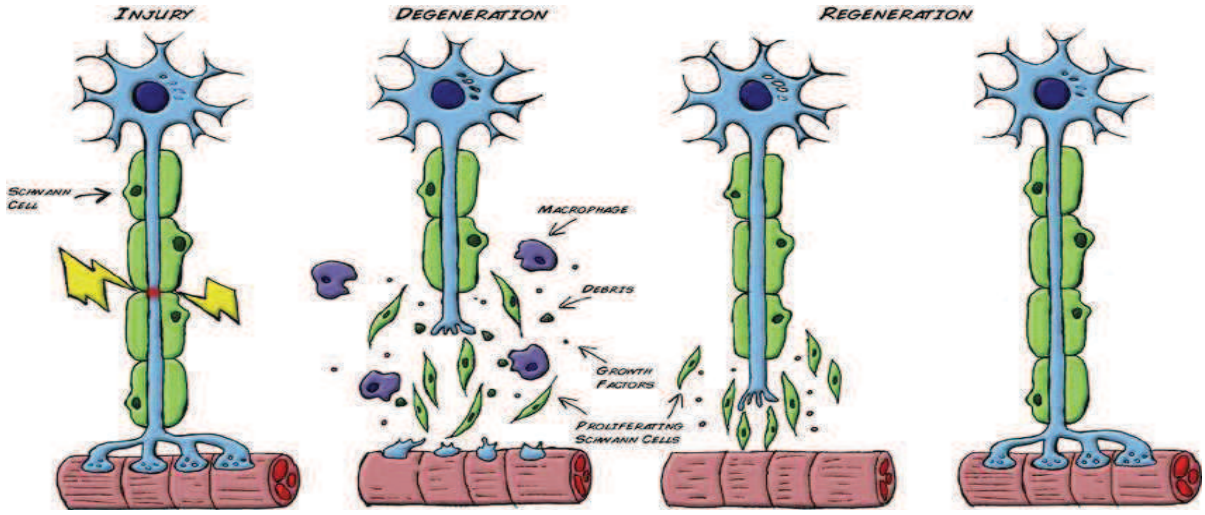
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- 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.

In deze studie willen wij moleculaire processen die een rol spelen bij de afbraak van de myelinelaag van zenuwen zoals die ontstaat bij de **zenuwziekte CMT (Charcot Marie Tooth)** onderzoeken. CMT is een hereditaire motorische en sensorische neuropathie in het perifere zenuwstelsel. CMT komt bij zeker één op de tienduizend mensen voor. Er zijn twee vormen van deze ziekte. Bij CMT type 1 (demyeliniserend type) is primair de isolerende laag om de zenuwvezels, de myelinelaag, aangetast. Hierdoor worden de signalen minder goed doorgegeven (saltatorische geleiding via de knopen van Ranvier). Bij CMT type 2 (axonale type) zijn de zenuwvezels zelf, de axonen, aangetast. Het aantal zenuwvezels neemt uiteindelijk af in beide vormen van CMT. In deze studie bestuderen wij de processen bij CMT type 1 waar er sprake is van **verlies van de myelinelaag** van perifere zenuwen. Dit leidt tot verlammingen bij deze patiënten. Er is geen behandeling voor deze ziekte. De afbraak van de myeline laag staat ook bekend als "Wallerse degeneratie" en is vernoemd naar de ontdekker Augustus Waller die dit proces beschreef na acute zenuwschade. We weten niet precies welke moleculaire mechanismen er voor zorgen dat de myelinelaag verdwijnt. Wij weten wel dat het gen PMP22 een rol speelt. Over-expressie (duplicatie) van dit gen resulteert in CMT type 1 in zowel mensen als muizen. Wij hebben een muismodel ontwikkeld dat 3 tot 4 kopieën van het CMT gen tot expressie brengt (C3 pmp22 muizen). Deze pmp22 over-expressie resulteert in een fenotype dat erg lijkt op de ziekte CMT1A in de mens. In deze muizen is er net als in de mens sprake van demyelinisatie , een spontane langzame (chronische) afbraak van de myelinelaag die in eerste instantie wel volledig is gevormd (dus geen dysmyelinisatie) . De spieren kunnen na demyelinisatie minder goed worden aangestuurd en door denervatie van de spieren zullen uiteindelijk de spieren zelf ook achteruit gaan (spier atrofie).

De myelinelaag wordt gevormd door **Schwann cellen** die om de axonen gewikkeld zitten. Deze laag beschermd de axonen en maakt saltatorische geleiding van elektrische pulsen door de zenuw mogelijk. Bij ziekte van de zenuw of schade door trauma breekt de myelinelaag af (demyelinisatie/Wallerse degeneratie). Deze afbraak van de myeline laag wordt gedaan door de Schwann cellen zelf (**autofagie**) en door **macrofagen**. Na verloop van tijd kan de myelinelaag langzaam herstellen (remyelinisatie) doordat de Schwann cellen zich weer om de axonen wikkelen. We hebben in eerder onderzoek ontdekt dat bij demyelinisatie het gen **c-Jun** in de Schwann cellen een belangrijke rol speelt ([redacted]). De regulatie van autofagie van Schwann cellen door c-Jun is hier waarschijnlijk verantwoordelijk voor. Om te kunnen onderzoeken wat de bijdrage is van c-Jun gemedieerde autofagie aan het proces van demyelinisatie hebben wij een muis met c-Jun deficiëntie in de Schwann cellen gemaakt. We willen vervolgens de demyelinisatie vergelijken in de c-Jun deficiënte en sufficiënte muizen. We kijken dan zowel bij snelle/ acute demyelinisatie die wij zelf induceren door zenuwschade op te wekken als bij spontane chronische (langzame) demyelinisatie in het CMT model (C3 pmp22 muis). Op deze manier kunnen we hier precies het onderscheid maken tussen demyelinisatie en remyelinisatie omdat we bij de zenuwcrush precies weten wanneer en waar we de crush op de zenuw zetten. In het natuurlijke ziekte proces zoals we dat in de C3 pmp 22 muis bekijken zien we de een mix van degeneratie en regeneratie in de zenuw. Op deze manier kunnen wij gaan zien wat de bijdrage is van c-Jun en onderliggende moleculaire routes op de autofagie van Schwann cellen tijdens acute en chronische demyelinisatie en remyelinisatie.

Naast autofagie door de Schwann cellen spelen macrofagen een grote rol bij het afbreken en opruimen van de myeline laag. Het **complement systeem**, een onderdeel van het aangeboren immuun systeem, is verantwoordelijk voor het activeren van deze macrofagen die de myelinelaag verwijderen (Ramaglia V et al J Neurosci. 2007 Jul 18;27(29):7663-72). Ons onderzoek heeft eerder duidelijk gemaakt dat remming van het complement systeem demyelinisatie vertraagt en **herstel van de zenuw** kan versnellen [redacted] In dit project zullen wij verder onderzoeken wat er gebeurd als wij het complement systeem remmen. Wat wij willen weten is welke moleculaire routes betrokken zijn bij het proces van demyelinisatie en remyelinisatie. Zijn de effecten van complement remming alleen van belang voor de macrofagen of misschien ook bij de autofagie door Schwann cellen? Welke andere moleculen zijn nog meer betrokken naast c-Jun en de complement factoren? Antwoorden op deze vragen kunnen nieuwe inzichten geven hoe demyelinisatie kan worden geremd en mogelijk hoe het zenuwherstel kan worden gestimuleerd.



Figuur 1: Wallerse Degeneratie. Bij schade aan zenuwen bijvoorbeeld door een acuut trauma of ziekte zoals CMT wordt de myeline laag bestaande uit Schwann cellen afgebroken. De zenuw kan zich daarna regenereren. Dit proces van regeneratie gaat echter heel langzaam bij de mens en is afhankelijk van de lengte van de zenuw. Bij denervatie van de spieren gaan deze achteruit (spieratrofie).

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

De algemene doelstelling van dit project is om inzicht te krijgen hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën

Met dit project willen we twee doelen bereiken:

1) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
2) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van CMT in muizen in aan en afwezigheid van complement remming.

Wij denken dat deze doelen haalbaar zijn omdat onze vakgroep al 20 jaar ervaring heeft met neurodegeneratieve ziekten en diermodellen van deze ziekten. Het LUMC heeft alle faciliteiten om dit onderzoek te kunnen doen. De transgene dieren zijn beschikbaar. Voor dit onderzoek is financiering verkregen van een Nederlands fonds dat onderzoek naar neurodegeneratieve ziekten betaald.

3.3 Belang

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

De ziekte van Charcot Marie Tooth (CMT) resulteert in verlammingen en sensorische storingen bij patiënten. De verschijnselen verergeren langzaam maar blijven beperkt tot de benen en armen. Doordat de spieren in de voeten en onderbenen, later ook in de onderarmen en handen niet goed worden aangestuurd, verzwakken ze. De eerste verschijnselen treden altijd op aan ledematen die het verst van de ruggengraat afliggen. De spierkracht neemt hier als eerste af. Het lopen kost meer moeite, men struikelt vaker en enkels verzwikken gemakkelijk. De onderbenen worden zichtbaar dunner. Later kan ook de spierkracht in handen en onderarmen afnemen. Een pen vasthouden of knopen vastmaken gaat moeilijker, of mensen laten snel dingen vallen. De ernst van dit klinische beeld is echter zeer divers.

Sommige patiënten komen al op jonge leeftijd in een rolstoel terecht terwijl anderen met dezelfde aandoening op hoge leeftijd alleen wat moeilijk lopen. Deze verschillen in ernst van de ziekte is zelfs aanwezig bij patiënten met exact dezelfde genetische fout, ook binnen één familie. Het lijkt er op dat er genetische "modifiers" zijn waardoor de ziekte variabel in ernst is. De meest voorkomende oorzaak is een over-expressie van het PMP22 gen. Door inzicht te krijgen hoe demyelinisatie optreedt als gevolg van over-expressie van PMP22 hopen wij meer inzicht te krijgen in mogelijk "modifiers" die mede de ernst van de ziekte bepalen. Ons onderzoek zal in eerst instantie een wetenschappelijk belang dienen, het begrijpen van de moleculaire processen die een rol spelen bij demyelinisatie. Echter deze kennis zou een eerste stap kunnen zijn om in de toekomst therapieën te ontwikkelen die de ziekte misschien kunnen sturen richting een langzamer verloop of mildere vorm. Zodat minder patiënten in een rolstoel belanden, en met slechts geringe beperkingen een volwaardig leven kunnen hebben. Belangrijk om te vermelden is dat de verkregen wetenschappelijke kennis niet alleen van toepassing zal zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie. Denk daarbij aan Guillain Barre syndroom (GBS), amyotrofische laterale sclerose (ALS), multiple sclerose (MS) en de ziekte van Parkinson. Hoewel de oorzaken van deze zenuwziekten verschillen is het proces van het verlies van de myelinelaag bij deze ziekten waarschijnlijk gelijk.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Wij gebruiken verschillende transgene muis modellen voor het beantwoorden van onze wetenschappelijke vragen:
Wij hebben een diermodel , [redacted] waarbij 3 tot 4 kopieën van het PMP22 gen tot expressie komen. Dit model geeft een zeer goed gelijkend ziekte beeld in de muis met het humane CMT type 1 [redacted]

Daarnaast gebruiken wij een transgene muis die geen c-Jun expressie heeft in zijn Schwann cellen. Deze c-Jun deficiente muis is gekruist met de C3 pmp 22 muis. Uit eerdere proeven blijkt dat c-Jun activatie in Schwann cellen zenuw herstel versnelt [redacted], [redacted] Onder c-Jun zitten mogelijk tientallen zo niet honderden genen die door c-Jun gereguleerd kunnen worden. Welke precies in Schwann cellen werken is niet bekend. Om dit uit te zoeken willen we de dubbel mutant muis gebruiken zoals beschreven in Hantke et al. Deze muis is een kruising van de c-Jun nul mutant specifiek in de Schwann cellen en onze C3 pmp 22 muis. Door deze dubbel transgene muis te vergelijken met de gewone C3 pmp 22 muis kunnen we met RNAseq ontdekken van welke genen de expressie c-Jun afhankelijk is tijdens het proces van demyelinisatie.

In deze diermodellen gaan wij daarnaast ook kijken wat het effect is van complement remming. In de C3 pmp22 muis willen wij testen of complement remming effect heeft op het verloop van de ziekte. In c-Jun-nul (specifiek in Schwann cellen) muizen willen wij kunstmatig demyelinisatie opwekken door een zenuw crush te geven. Na een zenuw crush (N. ischiadicus) treden dezelfde mechanismen in werking die demyelinisatie veroorzaken zoals dat spontaan gebeurt in de C3 pmp22 muis. Maar bij de zenuw crush kunnen we precies het onderscheid maken tussen demyelinisatie en remyelinisatie omdat we bij de zenuwcrush precies weten wanneer en waar we de crush op de zenuw zetten. In het natuurlijke ziekte proces zoals we dat in de C3 pmp 22 muis bekijken zien we de een mix van degeneratie en regeneratie in de zenuw tijdens een chronisch proces. De "Wallerse degeneratie" kunnen we dan volgen in de aan- (WT) en afwezigheid van c-Jun in Schwann cellen en in aan- en afwezigheid van complement remming en we kunnen zien hoe dit effect heeft op remyelinisatie. We gebruiken RNAseq en pathologische studies (immunohistologie) om de Wallerse degeneratie microscopisch en op moleculair niveau te volgen. De RNAseq stel ons instaat om "pathway analyse" te doen. We kunnen met de RNAseq data moleculaire routes identificeren die mogelijk een rol spelen bij de processen die wij bestuderen. Ook kunnen wij aan de hand van de pathway analyse voorspellingen doen welke moleculaire routes eventueel therapeutisch interessant kunnen zijn. De pathologische studies dienen ter ondersteuning (bevestiging/verificatie) van de bevindingen van de RNAseq data.

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 willen we de transcriptie profielen maken van demyeliniserende zenuwen van C3 pmp22 dieren in aan en afwezigheid van c-Jun en in aan- en afwezigheid van complement remming.
Het CMT model [redacted] C3 pmp 22 muizen ontwikkelen een vorm van CMT1a waarbij vanaf 3 weken de eerste tekenen te zien zijn. De C3 pmp22 muis wordt gekruist met een *Jun* $^{fl/fl}$ mouse en the P_0 Cre muis, die de Cre recombinase onder controle van een P_0 promoter tot expressie brengt specifiek in de Schwann cellen. Uiteindelijk genereren we een C3 *Jun* $^{fl/fl}$ P_0 Cre $^{+}$ (C3/c-Jun-cKO muis). Deze kruisingen zijn reeds gedaan bij een externe partner, een geregistreerd fok bedrijf in de EU waar we de gewenste muizen direct kunnen bestellen.

We gebruiken de dieren voor de volgende drie experimenten.

1 Transcriptie profilering van demyeliniserende zenuwen in het C3 pmp 22 model en C3 *Jun* $^{fl/fl}$ P_0 Cre $^{+}$ (C3/c-Jun-cKO muizen). Dit is een terminaal experiment. Deze dieren ondergaan eigenlijk geen handelingen behalve euthanasie bij het moment van doden. We gebruiken de perifere zenuwen voor RNAseq. Op verschillende leeftijden worden de dieren gedood voor uitnemen van perifeer zenuwweefsel (N. ischiadicus). Op 3 of 4 weken (na verspenen), 8 weken 12 weken en 24 weken worden dieren gedood. De tijdspunten waarop we genexpressie profielen maken zijn zo gekozen dat we alle aspecten (vroege en late effecten) van de ziekte moeten kunnen zien. Op deze manier kan een profiel worden gemaakt van gen expressie gedurende het hele ziekte proces.

2 Zenuw Crush model in WT en c-Jun knockout muizen in aan en afwezigheid van complement remmers. Voor het induceren demyelinisatie door Wallerse degeneratie in het perifeer zenuwstelsel maken we gebruik van een klassiek **perifere zenuw crush model** waar we in de Nervus ischiadicus een crush injury geven. Dit model is vele jaren bij ons in het lab in gebruik ([redacted] Toediening van complement remmers start voor de crush om er zeker van te zijn dat de remmers bij aanvang van de demyelinisatie werken. Na de zenuw crush wordt de myeline laag om de zenuw afgebroken gedurende 3-7 dagen waarna de zenuw weer herstelt. Het dier verliest met name sensorische functies in de voet en in beperkte mate ook motorische functie. Na 14 dagen is er weer volledig functioneel herstel. We volgen de dieren tot 3 weken na de crush. We gebruiken een sensorische test (footflick test) waarbij we het "gevoel" in de voet kunnen meten met elektrische schokjes. Als het dier iets voelt trekt het zijn pootje terug en dit is goed waar te nemen. In dit model kunnen we volgen wat het effect van c-Jun is en welk effect complement inhibitie heeft op het herstel in aan- of afwezigheid van c-Jun.

3 Effect van complement remming in het CMT model (C3 pmp22) en dubbel mutant dieren C3 *Jun* $^{fl/fl}$ P_0 Cre $^{+}$ (C3/c-Jun-cKO muizen): Behandeling met complement remmers start direct na verspenen gedurende 8 weken. We maken gebruik van ALZET osmotische pompjes voor de dosering van de complement remmers. Door gebruik te maken van Alzet pompen veroorzaken we zo min mogelijk ongerief omdat we geen complement remmers dagelijks hoeven toe te dienen middels injecties. We volgen de motorische functies van de dieren met standaard functionele testen (bijvoorbeeld grip strength, neurological score, rotarod, phenotyper en balance beam) om het verloop van de ziekte te volgen tot maximaal 24 weken en het effect van de behandeling met complement remmers te zien. We isoleren zenuwen uit de dieren op verschillende tijdstippen tijdens de proef. Zenuwweefsel wordt uitgenomen na euthanasie van de muizen.

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.

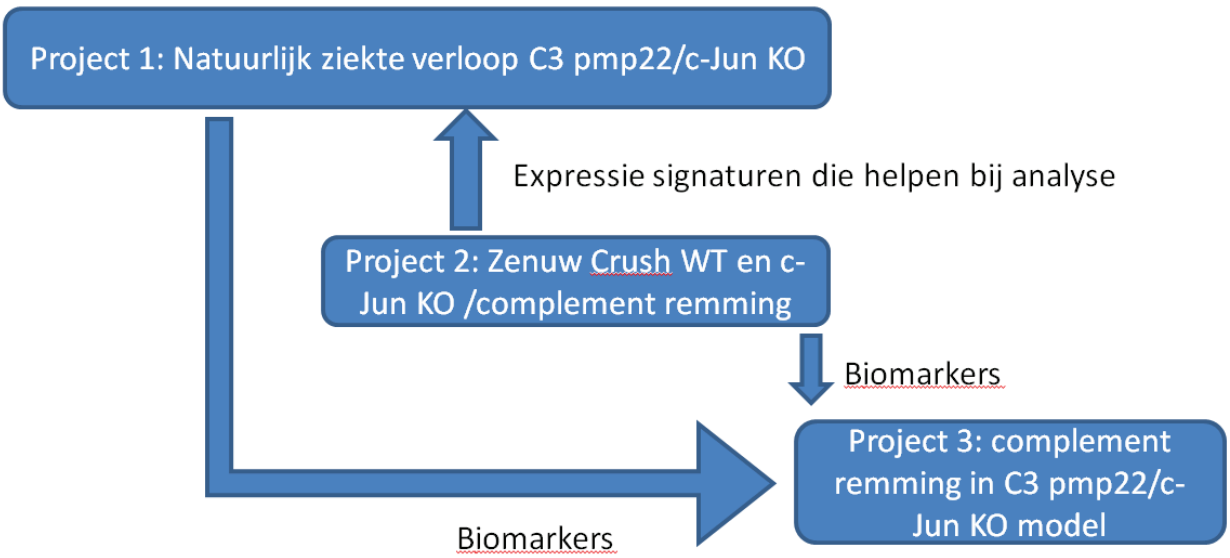
Dit onderzoek bestaat uit drie onderdelen die te samen ons een goed beeld gaan geven van de moleculaire processen tijdens demyelinisatie en de rol van c-Jun en het complement system. De proeven zijn qua uitvoering onafhankelijk van elkaar, maar de resultaten van onderdelen 1 en 2 kunnen gebruikt worden om biomarkers te definiëren die we kunnen testen tijdens onderdeel 3. De drie proeven staan in

de twee bijlagen beschreven.

Proef 1 (bijlage 1) is de transcriptie profilering van demyeliniserende zenuwen in het C3 pmp 22 model en C3 Jun fl/fl P 0 Cre + (C3/c-Jun-cKO muizen). Dit doen we tijdens de lopende fok. We isoleren RNA uit de weefsels voor RNAseq. Dit geeft ons informatie over de RNA expressie tijdens het natuurlijk verloop van de ziekte in de C3 pmp22 muis, in aan- of afwezigheid van c-Jun in de Schwann cellen.

Proef 2 (bijlage 2) geeft ons informatie over de moleculaire processen tijdens de acute fase van demyelinisatie en de daaropvolgende regeneratie. We gebruiken hier wildtype dieren voor en dieren die c-Jun negatief zijn in hun Schwann cellen. Deze dieren behandelen wij wel of niet met complement remmers. In tegenstelling tot proef één kunnen we hier precies het onderscheid maken tussen demyelinisatie en remyelinisatie omdat we precies weten wanneer en waar we de crush op de zenuw zetten. In het natuurlijke ziekte proces zoals we dat in proef 1 bekijken zien we de een mix van degeneratie en regeneratie in de zenuw. Dus proef twee kan ons helpen specifieke signaturen te bepalen waarmee we de data van proef één beter kunnen begrijpen.

Proef 3 (bijlage 1) laat ons zien of complement remming effect heeft op het natuurlijk ziekte verloop in het C3 pmp22 model en wat het effect van c-Jun is op deze behandeling. Dit geeft ons informatie of complement remming mogelijk gebruikt kan worden als therapie voor CMT patiënten. De informatie die wij hebben verkregen uit proef één en twee kunnen we gebruiken om biomarkers te selecteren die we kunnen gebruiken in project drie.



Figuur 2: Samenhang van de drie proeven (in deze figuur aangeduid als projecten)

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

Volgnummer	Type dierproef
1	C3 pmp22 model en de invloed van c-Jun expressie in de aan en afwezigheid van complement remmers
2	Zenuw crush model in wildtype en c-Jun knockout dieren; effect van complement remmers
3	

4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11600
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	LUMC
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: C3 pmp22 model en de invloed van c-Jun expressie in de aan en afwezigheid van complement remmers

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project willen wij inzicht krijgen in de moleculaire processen die plaats vinden tijdens demyelinisatie van perifere zenuwen in een diermodel van CMT.

Wij volgen het natuurlijk verloop van een neurodegeneratieve neuropathie in de C3 pmp 22 muis, een muis model voor de ziekte CMT type 1a. Dit is **proef 1** zoals beschreven in het projectvoorstel Wij doden dieren op gespecificeerde tijdstippen om perifere zenuwen te oogsten die we gebruiken voor de transcriptie profilering zodat we een beeld krijgen van de moleculaire processen tijdens het ziekte verloop. Dit zelfde doen wij in C3 PMP 22 dieren die zijn gekruist met c-Jun knockout dieren die specifiek geen c-Jun expressie hebben in de Schwann cellen die de myeline laag vormen (C3 c-*Jun* $^{fl/fl}$ P_0 Cre $^{+}$). Deze c-Jun knockout dieren hebben een verstoorde autofagie in de Schwann cellen.

Daarnaast kijken we in deze dieren of complement remming een therapeutische optie is. Dit is **proef 3** in het projectvoorstel. Uit eerder onderzoek is gebleken dat complement remming gunstig is voor de regeneratie van zenuwen. Dus wij willen testen of deze strategie werkt in het C3 pmp 22 model voor CMT en de kruising met de c-Jun knockout, Op deze manier hopen we te ontdekken of complement remming een therapeutische waarde heeft voor patiënten met de ziekte CMT.

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.

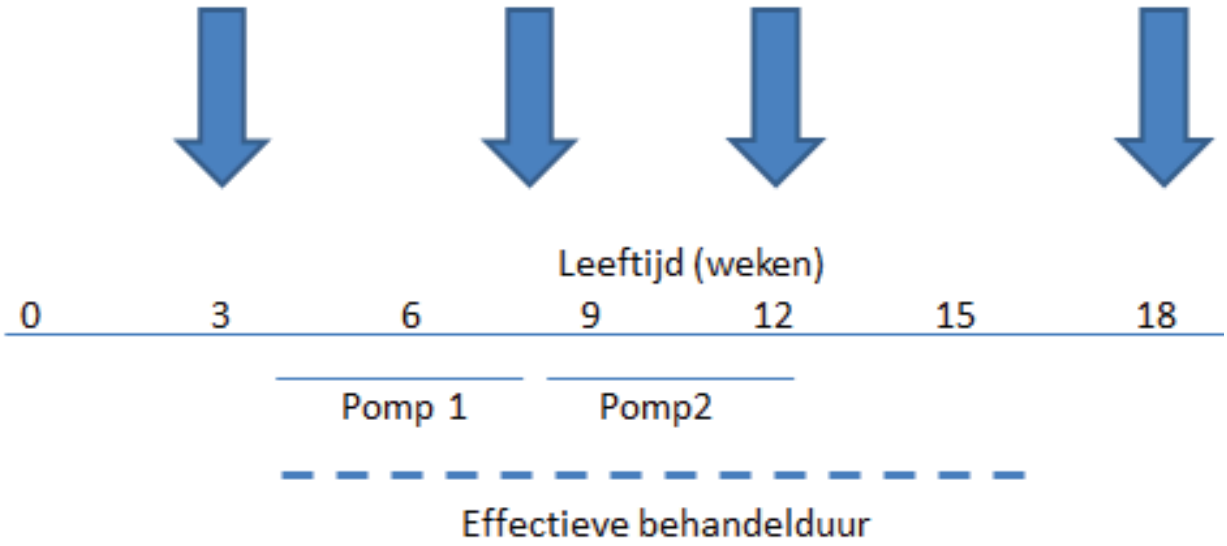
Proef 1: Zenuwen van C3 pmp22 muizen en C3 c-*Jun* $^{fl/fl}$ P_0 Cre $^{+}$ muizen worden uitgenomen na euthanasie. We doden de dieren op 3 weken (verspenen), 8 weken 12 weken en 18 weken. Deze tijdstippen zijn zo gekozen dat wij het hele ziekte proces in beeld kunnen krijgen, Vlak voor het begin van de ziekte,

tijdens demyelinisatie en in een laat stadium van de ziekte.

Proef 3: Behandelingen met complement remmers*:*

Dieren worden behandeld met complement remmers. Toediening doen we subcutaan middels osmotische minipompen die subcutaan geplaatst worden onder narcose. De maat van de osmotische pompen zal worden afgestemd met de IvD. We plaatsen deze osmotische pompen in de week na verspenen zodat de behandeling start voor er vergaande demyelinisatie optreed. We vervangen de pompen 1 malig. De complement remmers die wij gebruiken zijn stabiel en blijven ruim een maand na toediening werken [redacted] Dus met slechts twee osmotische pompen kunnen we complement tot 16 weken remmen. We willen gebruik maken van een complement C5 remmer en een C6 remmer. Er is een relevant biologisch verschil tussen C5 en C6 remming. Bij C5 remming verstoren wij ook de vorming van C5a (een chemoattractant) terwijl bij C6 remming er echt alleen remming plaats vindt op het terminale deel van het complement systeem (Membrane Attack Complex, MAC). Dit verschil heeft mogelijk effect op activatie en de attractie van perifere macrofagen.

Regelmatig meten we het lichaamsgewicht, doen wij neurologische motor testen en controleren wij de dieren op hun algemene uiterlijk.



Figuur 1: Schematische weergave van de proefopzet. De pijlen geven het moment van doden aan voor de analyse van genexpressie. De effectieve werking (behandelduur) van de complement remmers is langer dan de tijdsduur van afgifte door de pompen, omdat de complement remmers die wij gebruiken langdurig werken.

We volgen de motorische functies van de dieren met standaard functionele testen (grip strength, neurological score, balance beam, rotarod, phenotyper kooi en hanging wire) om het verloop van de ziekte te volgen tot maximaal 18 weken en het effect van de behandeling met complement remmers te zien. Deze testen zijn gevalideerd voor het C3 pmp22 model in eerder onderzoek. De testen worden om de 3 weken herhaald vanaf week 4. De "grip strength" test is een simpele test waar de muis wordt geplaatst op een metalen gridje waar hij zich goed kan vasthouden. Het gridje is verbonden aan een newtonmeter die de kracht meet die op het gridje staat. Door aan de staart van de muis langzaam naar achteren te trekken kunnen we dan meten hoe goed de muis zich kan vasthouden en bij welke kracht hij moet loslaten (figuur 2 laat pilot data van deze assay zien). Bij de "balance beam "lopen de dieren over een small stokje en kijken we hoe goed ze blijven staan of lopen. Sensorimotorische coordinatie wordt gemeten door de tijd te meten die nodig is om het stokje over te lopen en het aantal misstappen te tellen. Een gezonde muis heeft geen enkele moeite met deze oefening maar dieren met een neuropathie maken steeds meer fouten en lopen langzamer over het stokje. De neurological score is een punten systeem waar we scoren op het uiterlijk van de muis. Of ze slepen met hun pootjes, de houding van de staart en of er een tremor te zien is:

Neurologische Score:

Pelvic elevation (0-3):
0: Markedly flattened
1: Barely touches floor
2: Normal (3 mm)
3: Elevated (>3 mm)

Tail elevation (0-3):
0: None, dragging
1: Horizontally extended
2: Diagonally elevated, 45 degrees
3: Vertically upright, 90 degrees
4: Diagonally retrograde, 135 degrees

Hindlimb splay (0-3):
0: None (normal)
1: Moderate
2: Marked

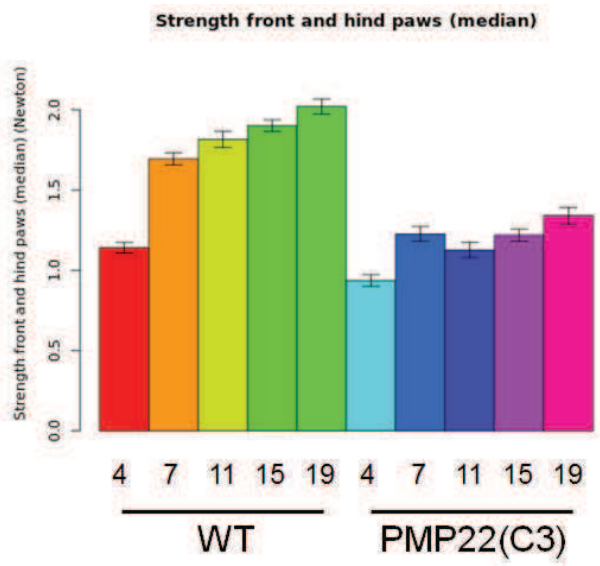
Tremor (hindlimbs/tail) (0-2):
0: None (normal)
1: Moderate
2: Marked

Bij de Hanging wire test moeten de dieren hangen aan de voorpoten aan een strak gespannen koord. De tijd wordt gemeten totdat ze vallen. Een gezonde muis zal direct met alle pootjes op de draad klimmen. Maximaal tijdsduur van de test is 180 seconden.

Bij de standaard rotarod test moeten dieren op een draaiende cylinder blijven lopen die met toenemende draaisnelheid van 4 tot 40 rpm ronddraait. De tijd en snelheid van de rotarod waarop dieren het niet meer kunnen bijbenen en van de cylinder vallen wordt bepaald.

De phenotyper kooi is een systeem waarbij de dieren vrij bewegen door een speciale kooi waarbij al hun bewegingen gevolgd worden door een camerasysteem verbonden aan een computer waarbij de normale activiteit van de dieren (loopafstand, rusttijd) gemeten kan worden. Per meting worden dieren gedurende 1 dag/ nacht individueel huisvest.

We isoleren zenuwen uit de dieren op verschillende tijdstippen tijdens de proef. Zenuwweefsel voor analyse wordt uitgenomen na euthanasie van de muizen.



Figuur 2: Grip strengh analyse van C3 pmp 22 muizen vs WT dieren. Er is gemeten op 4-19 weken leeftijd. N=16 dieren per groep

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

De hoeveelheid RNA die we uit de Nervus ischiadicus kunnen isoleren is bepalend is voor het aantal dieren dat nodig is.

Isolatie van weefsels voor RNAseq: Om voldoende RNA te kunnen isoleren uit de N.ischiadicus van muizen is onze ervaring dat er minimaal 10 dieren nodig zijn per tijdspunt. RNA extractie uit perifere zenuwen gaat relatief moeizaam door de myeline (vetten in de myeline laag). Daarnaast is de opbrengst van RNA bij zieke dieren relatief laag dieren door verlies van Schwann cellen.

Testen van complement remmers: Er zijn zestien dieren nodig per groep. Dit komt voort uit praktische overwegingen. Voor RNA isolaties hebben we minimaal 10 dieren nodig omdat het onze ervaring is dat de RNA isolaties uit de N. ischiadicus lage opbrengsten hebben zeker bij zieke dieren. Daarnaast willen wij weefsel gebruiken voor pathologie. Drie dieren voor paraffine en drie dieren voor vriescoupes. Zestien dieren is ruim voldoende voor statistische significante bij de functionele testen (grip strength, balance beam en neurologische score). Een power analyse (power 0.8 met een significatie van p=0.05) gebruik makend van de resultaten van de grip strength analyse uit eerdere proeven (figuur 2) laat zien dat we minimaal 12 dieren per groep nodig hebben om significante verschillen te meten in deze test op een leeftijd van 4 weken. Dus de zestien dieren die we uit puur praktische overwegingen nodig hebben zullen voldoende zijn voor functionele testen.

We doen alle testen met de beide geslachten. Dit doen we echter in aparte proeven waarbij we de geslachten apart testen omdat we uit eerder onderzoek weten dat het complement systeem en dan met name het terminaal complement systeem (C6 en C9) lager tot expressie komt in vrouwen. Expressie van terminaal complement kan een factor 10 verschillen tussen mannen en vrouwen. De groepsgrootte voor de proeven met mannen of vrouwen is gelijk.

B. De dieren

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

We gebruiken muizen omdat deze dieren een vergelijkbaar aangeboren immuun systeem hebben zoals de mens en in deze dieren verloopt Wallerse degeneratie min of meer gelijk aan de mens. Muizen zijn verder handig in dit soort experimenten omdat ze sneller herstellen dan bijvoorbeeld ratten (of andere grotere dieren).Dit komt omdat de lengte van de aangedane zenuw korter is bij muizen in vergelijking tot grotere dieren of mensen Dit maakt het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid.

Muizen vanuit (commerciële) fok EU en eigen fok. Leeftijd tussen de 3-18 weken. We gebruiken wildtype dieren (C57/Bl6 achtergrond), en muizen met relevante mutaties zoals C3 PMP 22 dieren, en de C3 PMP22 c-*Jun* $^{fl/fl}$ *P* $_{0}$ Cre $^{+}$ muis die geen c-Jun tot expressie brengt in de Schwann cellen.

RNA isolaties/RNAseq van de N. Ischiadicus tijdens natuurlijk verloop ziekte in C3 pmp 22 en C3 c-*Jun* $^{fl/fl}$ *P* $_{0}$ Cre $^{+}$.

Totaal aantal dieren: 4 tijdspunten x 10 dieren x 2 geslachten x 3 stammen=240 dieren

Testen complement remmers

De proeven worden gedaan in aan- of afwezigheid van complementremmers. We willen gebruik maken van onze complement remmers: een C5 remmer en een C6 remmer

Totaal aantal dieren:
Uitgaande van bovenstaande verwachten wij voor dit deel van het onderzoek: 16 dieren x 3 (C5 remmer, C6 remmer, controle) x 2 stammen x 2 geslachten =192 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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging
In dit project onderzoeken wij demyelinisatie, neurodegeneratie en regeneratie. In het verleden hebben wij gewerkt met in vitro co-culturen van zenuwcellen en Schwann cellen. Myelinisatie is echter in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen. Onze ervaring is dus dat dit soort processen niet goed in vitro kunnen worden bestudeerd. Het zenuwstelsel is een complex weefsel waar vele celtypen aanwezig zijn en waar ook immuun cellen worden gerecruteerd vanuit de bloedsomloop bij een ontsteking. Op al die cellen heeft het aangeboren immuunsysteem waaronder het complement systeem een interactie. Door de bloed zenuw barrière zijn er effecten van zowel het interne (residente) immuun systeem als het externe (systemisch) immuun systeem. V*ervanging* met alleen *in vitro modellen* is dus niet mogelijk om een goed antwoord te krijgen op onze vragen.

Vermindering
Bij het ontwerp van onze proeven gebruiken wij zo min mogelijk dieren door heel specifiek minimaal benodigde dieren aantallen te bepalen uitgaande van onze ervaring betreffende praktische zaken (bijvoorbeeld RNA opbrengst uit weefsel) en door gebruik te maken van statistische methoden zoals de power analyse .

Verfijning
We kiezen bewust voor deze knaagdiermodellen als een vorm van *verfijning* omdat deze modellen zeer reproduceerbaar zijn en geschikt zijn om de demyelinisatie te volgen dat op dezelfde manier plaats vindt in mensen met een degeneratieve zenuwziekte.

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

De muizen worden sociaal gehuisvest en materiaal om zich te verstoppen of mee te spelen is aanwezig. Dieren worden verdoofd en krijgen pijnbestrijding voor alle ingrijpende handelingen. De dieren worden goed gecontroleerd tijdens de proef om te voorkomen dat ze over de humane eindpunten gaan. Onze ervaring is dat het C3 pmp 22 muis model geen problemen heeft bij het eten of drinken in normale standaard kooien. Er zijn verder geen gevaren voor het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Dieren worden verdoofd (anesthesie) voor ingrepen en krijgen perioperatieve pijnbestrijding.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muismodellen die wij gebruiken hebben een perifere neuropathie die erg lijkt op CMT type 1A bij de mens. Dit betekent dat de dieren een toenemend licht verlies van spierkracht ondervinden. Tussen 3 en 7 weken begint dit zichtbaar te worden in testen. Net als bij mensen is het fenotype over het algemeen vrij mild. Echter in de kruising met de c-Jun knockout kan het fenotype wat sterker zijn. In geen geval heeft dit effect op het vermogen van de muis om voor zichzelf te zorgen. Onze ervaring is dat de dieren geen problemen hebben tot en met de leeftijd van 8 maanden. Voor de zekerheid laten we dieren niet ouder worden dan die 8 maanden. Osmotische pompen die subcutaan worden geplaatst worden goed verdragen. Ook bij het vervangen van de pomp is er in onze ervaring nooit een probleem.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Perifere neuropathie

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

Dieren worden regelmatig gecontroleerd. Humane eindpunten zijn zodanig gedefinieerd dat het ongerief nooit groter wordt dan matig.

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.

Samen met de IvD zal een score tabel worden opgesteld voor de toepassing van de eindpunten.

Plotseling verlies lichaamsgewicht (>15% tov hoogst gemeten gewicht). Uiterlijke kenmerken die wijzen op ziekte 24 uur na crush (bol zitten, pilo-erectie etc). Ontsteking bij de osmotische pomp.

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

Onze ervaring is dat het lager dan 5% zal zijn.

K. Classificatie van ongerief

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

Progressie van ziekte (verlies spierkracht): licht ongerief (alle=432 dieren)

Functionele testen: licht ongerief (192 dieren)

Plaatsen en vervangen van pompen onder anesthesie: licht ongerief (192 dieren)

Doden voor isolatie van weefsels: licht ongerief (alle)

Cumulatief : Alle dieren ondervinden cumulatief 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.

We hebben hun zenuwen nodig voor onderzoek

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

4.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11600
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	LUMC
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Zenuw crush model in wildtype en c-Jun knockout dieren; effect van complement remmers

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De bijlage beschrijft **proef 2** zoals vermeld in de projectaanvraag. Wij willen inzicht krijgen in de moleculaire processen die plaats vinden tijdens demyelinisatie van perifere zenuwen door Wallerse degeneratie en de daaropvolgende regeneratie. Wij willen specifiek weten de processen zien in dieren die een verstoorde autofagie in de Schwann cellen hebben door gebrek aan expressie van c-Jun in vergelijking met wildtype dieren. Daarnaast kijken we welke invloeden complement remmers hebben op deze processen. Het doel is om zo zicht te krijgen op processen die de degeneratieve zenuwziekte CMT veroorzaken en een eventuele therapeutisch gebruik van complement remmers.

Voor het induceren van neuro-inflammatie na trauma in het perifeer zenuwstelsel maken we gebruik van een klassiek perifere zenuw crush model waar we in de Nervus ischiadicus een crush injury geven (zie figuur 1 hieronder). Dit model is vele jaren bij ons in het lab in gebruik [redacted] Na pre operatieve analgesie kan de zenuw eenvoudig onder volledige narcose worden vrijgeprepareerd in het achter dijbeen van de muis. Na de zenuw crush (door gestandariseerd met een gladde pincet te knijpen) wordt de zenuw voorzichtig tussen de spierlagen terug geplaatst en wordt de wond gehecht. De zenuw in het andere dijbeen die niet gecrushd wordt dient als controle. Initieel is er weinig te zien aan het dier na ontwaken. Het dier loopt normaal. Primaire meetwaarde voor het volgen van het verloop van zenuwschade is het meten van de sensorische functie. Dit meten we via een “footflick test” waarbij met een electrode elektrische stroomstootjes (pijnprikkels) kunnen worden gegeven (De Koning et al J. Neurol. Sci., 74 (1986), pp. 237–246) op de voetzool van het dier. Bij het optreden van neuro-inflammatie en Wallerse degradatie van de myeline laag verliest het dier gevoel bij de voetzolen en reageert het niet meer op prikkels. Na 3 dagen is dit effect maximaal waarna langzaam herstel op treedt. Uiteindelijk is er volledig herstel van alle functies binnen 2 weken. In afwezigheid van complement is dit herstel 1 week

eerder dan in wildtype dieren [redacted]We remmen complement wel of niet door gebruik te maken van remmers die complement factor C5 of C6 remmen en dieren die C5 of C6 deficiënt zij en nemen we weefsel monsters na offeren van het dier op verschillende tijdspunten voor RNA isolatie en RNAseq.

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.

Behandelingen met complement remmers:

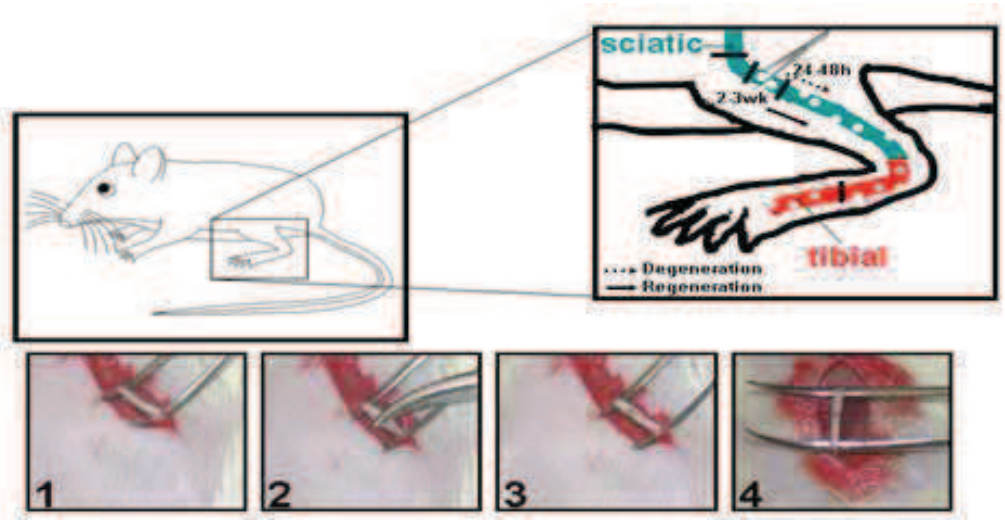
Dieren worden voor inductie van trauma behandeld. Toediening doen we subcutaan middels osmotische minipompen die subcutaan geplaatst worden onder narcose of subcutane injecties 3 x per week. De maat van de osmotische pompen zal worden afgestemd met de IvD. Bij het gebruik van pompen krijgen de dieren krijgen 1 malig 1 pomp die 1 week voor de crush geplaatst wordt. We willen gebruik maken van een complement C5 remmer en een C6 remmer. Er is een relevant biologisch verschil tussen C5 en C6 remming. Bij C5 remming verstoren wij ook de vorming van C5a (een chemoattractant) terwijl bij C6 remming dit niet gebeurd en er echt alleen vorming van het membrane attack complex, het terminale deel van het complement systeem, wordt voorkomen. Dit verschil heeft effect op activatie en de attractie van perifere macrofagen.

Handelingen zenuw crush model:

Het model is beschreven in [redacted]

Dieren krijgen vooraf analgesie.

De dieren worden onder narcose gebracht (gas anesthesie).
De dijbeen van het dier wordt geschoren. De Nervus ischiadicus wordt vrijgeprepareerd (figuur 1). Met een gladde pincet wordt in de zenuw geknepen. Dit is een gestandariseerde en reproduceerbare procedure. In voorgaand onderzoek hebben wij de crush procedure gestandariseerd met behulp van speciale pincetten waarbij de kracht van de crush elektronisch gemeten kan worden [redacted]. De zenuw wordt terug geplaatst tussen de spierlagen en de wond wordt gehecht.
Eventueel kan met een kleine ligatuur van zwart hechtdraad de plek van crush worden aangegeven op de zenuw zodat deze later makkelijker is terug te vinden. De andere poot dient als controle. De zenuw wordt vrijgeprepareerd maar niet gecrushd.



Figuur 1: Schematische weergave van het nerve crush model waarbij de nervus ischiadicus met behulp van een pincet wordt gecrushed (1-4). Wallerse degeneratie en neuro-inflammatie treed op in de eerste 24-48 uur na crush. Herstel van de zenuw kost 2 weken als MAC geremd wordt of 3 weken als er geen MAC remming is.

Direct na crush als de dieren weer wakker zijn is er weinig te zien aan de dieren. Verstoring van met name sensorische functie treedt meestal op na 24 uur. Dieren kunnen dan ook een beetje gaan slepen met het pootje. Herstel is 100% na 2 weken.

Regelmatig meten we het lichaamsgewicht en de sensorische functie.

Handelingen footflick testen (meten sensorische functie):
Bij de footflick test wordt een elektrode gehouden tegen de achterpoot van het dier. Een elektrisch stroompje wordt langzaam opgevoerd totdat een pijn prikkel (elektrische schokjes) door het dier ervaren wordt en hij zijn pootje terugtrekt. De hoeveelheid stroom die nodig is om een sensorische reactie uit te lokken is een maat voor de gevoeligheid van het pootje. Dieren worden na een zenuw crush ongevoelig voor pijnprikkels en dit gevoel keert langzaam weer terug als de zenuw herstelt. Dus het meten van de terugkeer van sensorische functie gebruiken wij als een maat voor zenuwherstel.

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

Er zijn per tijdspunt 10 dieren nodig, uit ervaringen van eerdere projecten. Elk dier is zijn eigen controle. 1 pootje ondervindt de crush, het andere pootje dient als controle. Dit geldt voor alle proeven/ bepalingen. Voor het meten van effecten op regeneratie snelheid (bijvoorbeeld als we behandelingen willen testen) geldt een minimale grootte van 9 per functionele analyse groep. Er kan dan significant verschil in de footflick functie gemeten worden (power 80%). We meten dan in de footflick het verschil in elektrische stroom (micro Ampere) waarbij dieren blijk geven van sensorische functie in de voet. Uit eerder proeven blijkt bijvoorbeeld dat op dag 12 na crush onbehandelde dieren reageren bij een stroom van 340 uA en dat met complement remmers behandelde dieren reageren bij 200 uA met een SD van 100. Met 10 dieren per tijdspunt kunnen we onverhoopte uitval opvangen.

B. De dieren

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

We gebruiken muizen omdat deze dieren een vergelijkbaar aangeboren immuun systeem hebben zoals de mens en in deze dieren verloopt Wallerse degeneratie min of meer gelijk aan de mens. Muizen zijn verder handig in dit soort experimenten omdat ze sneller herstellen dan bijvoorbeeld ratten (of andere grotere dieren). Dit maakt het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid. We gebruiken in dit deel van het onderzoek zowel mannelijke en vrouwelijke dieren. Omdat complement niveaus lager zijn in vrouwen (factor 10) moeten de proeven apart gedaan worden voor mannen en vrouwen. De groepsgrootte voor de proeven met mannen of vrouwen is gelijk.

Muizen vanuit (commerciële) fok EU. Leeftijd tussen de 8-12 weken. We gebruiken wildtype dieren (C57/Bl6 achtergrond) en een relevante mutante stam zoals de c-*Jun* $^{fl/fl}$ *P* $_{0}$ Cre $^{+}$ muis die geen c-Jun tot expressie brengt in de Schwann cellen.

De proeven worden gedaan in aan- of afwezigheid van complementremmers. We willen gebruik maken van onze complement remmers: een C5 remmer en een C6 remmer
Uit eerder onderzoek weten wij welke tijdspunten belangrijk zijn. We plannen de tijdspunten als volgt: 6 uur, 24 uur, 48 en 72 uur, 1 week en 2 weken na trauma.

Totaal aantal dieren:

Uitgaande van bovenstaande verwachten wij voor dit deel van het onderzoek: 6 tijdspunten x 10 dieren x 2 (c5 remmer, C6 remmer) x 2 stammen x2 geslachten=480 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 welk keuzes daarbij zijn gemaakt.

Vervanging
In dit project onderzoeken wij demyelinisatie, neurodegeneratie en regeneratie. In het verleden hebben wij gewerkt met in vitro co-culturen van zenuwcellen en Schwann cellen. Myelinisatie is echter in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen. Onze ervaring is dus dat dit soort processen niet goed in vitro kunnen worden bestudeerd. Het zenuwstelsel is een complex weefsel waar vele celtypen aanwezig zijn en waar ook immuun cellen worden gerecruteerd vanuit de bloedsomloop bij een ontsteking. Op al die cellen heeft het aangeboren immuunsysteem waaronder het complement systeem een interactie. Door de bloed zenuw barrière zijn er effecten van zowel het interne (residente) immuun systeem als het externe (systemisch) immuun systeem. V*ervanging* met alleen *in vitro modellen* is dus niet mogelijk om een goed antwoord te krijgen op onze vragen.

Vermindering
Bij het ontwerp van onze proeven gebruiken wij zo min mogelijk dieren door heel specifiek minimaal benodigde dieren aantallen te bepalen uitgaande van onze ervaring betreffende praktische zaken (bijvoorbeeld RNA opbrengst uit weefsel) en door gebruik te maken van statistische methoden zoals de power analyse .

Verfijning
We kiezen bewust voor deze knaagdiermodellen als een vorm van *verfijning* omdat deze modellen zeer reproduceerbaar zijn en geschikt zijn om de demyelinisatie te volgen dat op dezelfde manier plaats vindt in mensen met een degeneratieve zenuwziekte. Het betreft een nauwkeurig model met een interne controle (het andere achterpootje).

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

De muizen worden sociaal gehuisvest en materiaal om zich te verstoppen of mee te spelen is aanwezig. Dieren worden verdoofd en krijgen pijnbestrijding voor alle ingrijpende handelingen. De dieren worden goed gecontroleerd tijdens de proef om te voorkomen dat ze over de humane eindpunten gaan. Er zijn geen gevaren voor het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Dieren worden verdoofd voor ingrepen en krijgen pijnbestrijding.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In dit muis model wordt traumatisch letsel in het perifere zenuwstelsel opgewekt. Dit heeft gevolgen voor met name de sensorische functies in de aangedane poot. De dieren verliezen gevoel in dat pootje. Bij gebruik van ratten in een dergelijk model is onze ervaring dat ze wel eens gaan knagen aan hun eigen gevoelloze pootje, maar bij muizen hebben we dit nog nooit gezien. We letten er echter wel goed op en mocht het toch gebeuren dan kunnen we de pootjes insmeren met middelen die heel vies smaken (Bite-X). In het zenuw crush model zijn er volgens onze ruime ervaring geen complicaties te verwachten. Het enige denkbare is dat de wond geïnfecteerd raakt maar dat hebben we in al die jaren dat we het model gebruiken nog nooit gezien. Er is mogelijk sprake van stress, voor een vluchtdier als de muis, als gevolg van het uitvallen van de spierfunctie in de pootjes.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1 Neuronaal trauma, 2 Infectie wond, 3 automutilatie.

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

Dieren worden dagelijks gecontroleerd. In het geval van knagen aan de eigen poten gebruiken we Bite-X. Humane eindpunten zijn zodanig gedefinieerd en worden toegepast dat het ongerief matig blijft.

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.

Ontstekingen aan de poot, automutilatie. Plotseling verlies lichaamsgewicht (>15% tov hoogst gemeten gewicht). Uiterlijke kenmerken die wijzen op ziekte 24 uur na crush (bol zitten, piloerectie etc). Samen met de IvD zal een score tabel worden opgesteld voor de toepassing van de eindpunten.

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

Maximaal 10%

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.

Zenuw crush: matig ongerief (alle=480)

Functionele testen: licht ongerief (alle dieren)

Plaatsen van pompen onder anesthesie of injecties : licht ongerief (alle)

Doden voor isolatie van weefsels: licht ongerief (alle)

Cumulatief : Alle dieren ondervinden uiteindelijk 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.

We hebben hun zenuwen nodig voor onderzoek

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja

5.

Ref. A:
animal data for Dier Experimenten Commissie

PROJECT DETAILS:

project number:	AVD116002017890
title:	Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.
responsible scientist:	[redacted]

appendix #	species	age	number	sexe	GMO?	short discription of model & interventions	cumulative discomfort
1	mouse	8-12 weken	240	both	yes	RNA isolaties/RNAseq van de N. Ischiadicus	moderate
1	mouse	8-12 weken	192	both	yes	Testen complement remmers	moderate
2	mouse	8-12 weken	240	both	no	Zenuw crush model in wildtype	moderate
2	mouse	8-12 weken	240	both	yes	Zenuw crush model in c-Jun knockout	moderate

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017890

2. Titel van het project: Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.

3. Titel van de NTS: De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth.

4. Type aanvraag:
   - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: DEC Leiden
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon: [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ✓ ontvangen door DEC: 12-04-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 12-04-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 04-05-2017
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ✓ termijnonderbreking(en) 26-05-2017 t/m 30-05-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 30-05-2017
   - ✓ advies aan CCD: 01-06-2017

7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD

8. Eventueel horen van aanvrager
   N.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 26-05-2017
   - Strekking van de gestelde vragen:
     De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de meerwaarde van RNAseq, de noodzaak van 2 modellen, het maatschappelijke belang, het verwijderen van de minipompjes, het ongerief, het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, de verfijning en de humane eindpunten.
   - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
    N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.

4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Wat is een project': Het onderzoek bestaat uit drie onderdelen die samen een goed beeld geven van de moleculaire processen tijdens demyelinisatie en de rol van c-Jun en het complement system. De proeven zijn qua uitvoering onafhankelijk van elkaar, maar de resultaten van onderdelen 1 en 2 kunnen gebruikt worden om biomarkers te definiëren die getest kunnen worden tijdens onderdeel 3. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

   Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is tweeledig:
   a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
   b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.

   Het uiteindelijke doel is om inzicht te krijgen hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.
   De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat remming van het complement systeem demyelinisatie vertraagt en herstel van de zenuw kan versnellen. Het is echter niet bekend welke moleculaire routes betrokken zijn bij het proces van demyelinisatie en remyelinisatie. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd zijn de proefdieren, de onderzoekers

en de patiënt en diens naasten.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen over de moleculaire processen die een rol spelen bij demyelinisatie. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: de verkregen kennis zou een eerste stap kunnen zijn om in de toekomst therapieën te ontwikkelen die de ziekte kunnen sturen richting een langzamer verloop of mildere vorm. Hierdoor belanden minder patiënten in een rolstoel en zouden zij met geringe beperkingen een volwaardig leven kunnen hebben. Daarnaast kan de verkregen wetenschappelijke kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals bij ALS, MS en de ziekte van Parkinson.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot neurodegeneratieve ziekten en diermodellen van deze ziekten. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Daarnaast zijn er subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.

8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van een afwijkende locatie en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.

10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.

11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van de zenuw crush matig ongerief ondervinden. Van het fenotype, het plaatsen en vervangen van

de minipomp onder anesthesie en de functionele testen ondervinden de muizen gering ongerief. Naar inziens van de DEC zullen alle dieren echter cumulatief matig ongerief ondervinden. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal een groot aantal dieren een operatie ondergaan waarbij er een minipomp subcutaan geplaatst wordt. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.

13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Muizen hebben een aangeboren immuun systeem vergelijkbaar met de mens. Daarnaast herstellen muizen sneller dan bijvoorbeeld ratten. Hierdoor is het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid. Het gekozen muismodel brengt 3 tot 4 kopieën van het CMT gen tot expressie wat resulteert in een fenotype dat erg lijkt op de ziekte CMT1A in de mens. In deze muizen is er net als in de mens sprake van demyelinisatie, een spontane langzame afbraak van de myelinelaag die in eerste instantie wel volledig is gevormd. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren. Myelinisatie is in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Zo heeft elk dier in het zenuwcrush model zijn eigen interne controle waardoor er geen extra controle groepen nodig zijn. Naar inzien van de DEC is de strategie helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.

16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.

17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate gebruiken. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De zenuwen worden geïsoleerd voor verdere analyse. Dit is van essentieel belang om de experimenten goed te beoordelen en is niet mogelijk zonder het dier te doden. Het doden van de dieren gebeurd volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

    NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het directe doel, te weten:
   a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
   b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.
   Met als uiteindelijke doel het verkrijgen van meer inzicht over hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd.
   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
   Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
   Waarden die voor de patiënten (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.
   De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.
   De ziekte van Charcot Marie Tooth (CMT) is een hereditaire motorische en sensorische neuropathie in het perifere zenuwstelsel die resulteert in verlammingen en sensorische storingen bij patiënten. CMT komt bij zeker één op de tienduizend mensen voor. De ernst van het klinische beeld is echter zeer divers. Sommige patiënten komen al op jonge leeftijd in een rolstoel terecht terwijl anderen met dezelfde aandoening op hoge leeftijd alleen meer moeite hebben met lopen of vaker struikelen. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. De DEC acht het verkrijgen van meer inzicht in welke processen een rol spelen bij de afbraak van de myelinelaag van zenuwen van essentieel belang voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën zodat de ziekte een langzamer verloop of een mildere vorm krijgt. Daarnaast kan de verkregen kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals ALS, MS en de ziekte van Parkinson. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
     - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
     - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
     - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:…
     - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
     - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dillema’s naar voren gekomen.

7.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
[redacted]
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN

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
AVD116002017890
Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 augustus 2017. Het gaat om uw project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002017890. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11600
Naam instelling of organisatie:	Academisch Ziekenhuis Leiden
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	27366422
Straat en huisnummer:	Albinusdreef 2
Postbus:	9600
Postcode en plaats:	2300 RC LEIDEN
IBAN:	NLIIDEUT0451001400
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	NLIIDEUT0451001400

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2018
Geplande einddatum:	31 december 2022
Titel project:	Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.
Titel niet-technische samenvatting:	De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth
Naam DEC:	Secretariaat DEC LUMC
Postadres DEC:	[redacted] 2300 RC Leiden
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.287,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	gemandateerd vergunninghouder
Plaats:	Leiden
Datum:	6 juni 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
[redacted]
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN

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
AVD116002017890

Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 8 augustus 2017
Vervaldatum: 7 september 2017
Factuurnummer: 170890

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD116002017890	€ 1.287,00

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

8.

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: donderdag 24 augustus 2017 15:18
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: AVD116002017890: aanvullende informatie

Categorieën: Dossier: [redacted]

Beste [redacted]
Allereerst bedankt voor de vragen in relatie tot dit project.
De aanvrager heeft in afstemming met de [redacted] (Instantie voor Dierenwelzijn) de antwoorden geformuleerd. De antwoorden zijn zojuist via de portal ingediend.
Het betreft het volgende bestand:

- AVD116002017890_antwoord op vragen van de CCD

Ik ga ervan uit dat dit bestand via de portal goed is aangekomen. Zou dit niet het geval zijn, dan horen we dat uiteraard graag.
Met vriendelijk groet,

[redacted]
Secretaris Instantie voor Dierenwelzijn
Leids Universitair Medisch Centrum / Universiteit Leiden
[redacted]
[redacted] Postbus 9600, 2300 RC Leiden
[redacted]
[redacted]
Instantie voor Dierenwelzijn: [redacted]

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: woensdag 23 augustus 2017 10:09
To: Projectvergunningen Wet op de dierproeven (BEHDIV5)
Cc: [redacted]
Subject: AVD116002017890: aanvullende informatie

Geachte mevrouw [redacted]
Op 8 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD116002017890. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.
- U gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Vanwege het geslacht specifieke verschil in complement levels, is het volgens u noodzakelijk mannelijke en vrouwelijke dieren in aparte proeven te testen.
Deze handelswijze leidt echter tot een verdubbeling van het aantal proefdieren. U maakt niet inzichtelijk waarom het noodzakelijk is om alle proeven met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren. Kunt u, in het kader van vermindering, aangeven of het mogelijk is te starten met een van beide geslachten, terwijl alleen de belangrijkste uitkomsten in het andere geslacht worden geverifieerd?
- De functionele testen worden in de aanvraag geclassificeerd als licht ongerief. Aangezien de dieren de prikkels bij een aantal van deze testen niet kunnen ontlopen, is licht ongerief wellicht een onderschatting van het ongerief. Om
het ongerief van de functionele testen goed te kunnen inschatten, is meer informatie nodig over de frequentie van de testen en de tijd tussen de testen. U wordt verzocht dit toe te lichten.

Opsturen binnen veertien dagen
De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 24 augustus. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

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

Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)
-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 8 augustus 2017 15:19
Aan: 'PDC-LUMC-projectvergunning@lumc.nl'
CC: [redacted]
Onderwerp: OntvangstBevestiging 890
Geachte [redacted],
Deze brief is ook per post verzonden.
Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Beste collega's van de CCD,

Hierbij de antwoorden op uw vragen.

- U gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Vanwege het geslacht specifieke verschil in complement levels, is het volgens u noodzakelijk mannelijke en vrouwelijke dieren in aparte proeven te testen.
Deze handelswijze leidt echter tot een verdubbeling van het aantal proefdieren. U maakt niet inzichtelijk waarom het noodzakelijk is om alle proeven met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren. Kunt u, in het kader van vermindering, aangeven of het mogelijk is te starten met een van beide geslachten, terwijl alleen de belangrijkste uitkomsten in het andere geslacht worden geverifieerd?

Wij nemen het advies van de CCD over. Het is inderdaad onze strategie om eerst in het ene en dan in het andere geslacht te kijken als de eerste experimenten hier aanleiding toe geven. Er is een groot verschil in MAC niveaus tussen mannen en vrouwen. Muizen mannetjes hebben tot wel 10x (stamafhankelijk) zoveel MAC in vergelijking met vrouwen. Ook bij mensen zijn er grote verschillen in complement activiteit. Echter wij zijn het met de CCD eens dat we proeven eerst uitvoeren bij 1 geslacht en dan in een later stadium (in samenspraak met de IvD en deskundigen in het veld) bepalen welke proeven herhaald moeten worden in het andere geslacht. Wij vragen aan de CCD of dit op "werkprotocol niveau" kan worden bepaald.

- De functionele testen worden in de aanvraag geclassificeerd als licht ongerief. Aangezien de dieren de prikkels bij een aantal van deze testen niet kunnen ontlopen, is licht ongerief wellicht een onderschatting van het ongerief. Om
het ongerief van de functionele testen goed te kunnen inschatten, is meer informatie nodig over de frequentie van de testen en de tijd tussen de testen. U wordt verzocht dit toe te lichten.

Informatie over functionele testen in bijlage 1: We volgen de motorische functies van de dieren met standaard functionele testen:. Dit kunnen zijn: grip strength, neurological score, balance beam, rotarod, phenotyper kooi en hanging wire. Dit doen we om het verloop van de ziekte te volgen tot maximaal 18 weken en het effect van de behandeling met complement remmers te zien. De testen worden om de 3 weken herhaald vanaf week 4. Dus bijvoorbeeld voeren we de testen uit in week 4, 7, 10, 13, 16. Die testen worden zoveel mogelijk op 1 dag gedaan die week. De meeste testen duren een paar minuten per dier. Dus na die dag van testjes hebben de dieren weer 3 weken "vrij" .

Bij iedere hierboven beschreven test wordt het dier niet geforceerd een bepaald gedrag te vertonen. Het iedere test afzonderlijk geeft ongerief dat vergelijkbaar is met het ongerief van een open veld. Door de herhaling van de testen hebben we in lijn met het document op uw website ('notitie wat is een dierproef') het cumulatieve ongerief van de gedragstesten ingeschat als bovendrempelig en derhalve als licht ongerief. Het totale cumulatieve ongerief van de hele proef is voor de dieren matig.

Informatie over functionele testen in bijlage 2: Het betreft een sensorische test die het functieherstel van sensorische zenuwen meet. De test wordt meestal 3 a 4 x per week gedaan gedurende 2 weken. De test zelf duurt ongeveer 1 minuut per dier.

Hierbij wordt wel degelijk een pijn prikkel toegediend, maar het dier kan op het moment dat het dier het zelf wil zijn poot terugtrekken. Doordat de pijnprikkel langzaam opgevoerd wordt, zal het dier zelf kunnen aangeven wat hij wel of niet tolereert. Wij hebben deze test ingeschat als meer ongerief dan een open veld. Daarom hebben we deze test afzonderlijk ingeschat als licht ongerief. We hopen dat deze informatie meer duidelijkheid verstrekt om het ongerief in te schatten. Wij schatten het cumulatieve ongerief door de herhaling van de testen in als maximaal licht ongerief, het totale cumulatieve ongerief is voor de dieren matig.

Met vriendelijke groet

[redacted]

10.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
[redacted]
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN

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
AVD116002017890
Bijlagen
1

Datum 11 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 8 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem." met aanvraagnummer AVD116002017890. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij u vragen gesteld over het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren en de functionele testen. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Secretariaat DEC LUMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 juni 2017. Bij

de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Academisch Ziekenhuis Leiden
Adres:	Postbus 9600
Postcode en plaats:	2300 RC LEIDEN
Deelnemersnummer:	11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem." met aanvraagnummer AVD116002017890, volgens advies van Dierexperimentencommissie Secretariaat DEC LUMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar, Hoofd van het LDGA.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2017, ontvangen op 8 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. C3 pmp22 model en de invloed van c-Jun expressie in de aan en afwezigheid van complement remmers				
	Muizen (Mus musculus) /	432	100% Matig	
3.4.4.2. Zenuw crush model in wildtype en c-Jun knockout dieren; effect van complement remmers				
	Muizen (Mus musculus) /	480	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD116002017890

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

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

Aanvraagnummer:
AVD116002017890

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.

26-05-2017

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017890

2. Titel van het project: Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.

3. Titel van de NTS: De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth.

4. Type aanvraag:
   - ✓ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: DEC Leiden
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon: [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ✓ ontvangen door DEC: 12-04-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 12-04-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 04-05-2017
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ✓ termijnonderbreking(en) 26-05-2017 t/m 30-05-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 30-05-2017
   - ✓ advies aan CCD: 01-06-2017

7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD

8. Eventueel horen van aanvrager
   N.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum: 26-05-2017
   - Strekking van de gestelde vragen:
     De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de meerwaarde van RNAseq, de noodzaak van 2 modellen, het maatschappelijke belang, het verwijderen van de minipompjes, het ongerief, het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, de verfijning en de humane eindpunten.
   - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
    N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.

4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Wat is een project': Het onderzoek bestaat uit drie onderdelen die samen een goed beeld geven van de moleculaire processen tijdens demyelinisatie en de rol van c-Jun en het complement system. De proeven zijn qua uitvoering onafhankelijk van elkaar, maar de resultaten van onderdelen 1 en 2 kunnen gebruikt worden om biomarkers te definiëren die getest kunnen worden tijdens onderdeel 3. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

   Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is tweeledig:
   a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
   b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.

   Het uiteindelijke doel is om inzicht te krijgen hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.
   De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat remming van het complement systeem demyelinisatie vertraagt en herstel van de zenuw kan versnellen. Het is echter niet bekend welke moleculaire routes betrokken zijn bij het proces van demyelinisatie en remyelinisatie. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd zijn de proefdieren, de onderzoekers

en de patiënt en diens naasten.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen over de moleculaire processen die een rol spelen bij demyelinisatie. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: de verkregen kennis zou een eerste stap kunnen zijn om in de toekomst therapieën te ontwikkelen die de ziekte kunnen sturen richting een langzamer verloop of mildere vorm. Hierdoor belanden minder patiënten in een rolstoel en zouden zij met geringe beperkingen een volwaardig leven kunnen hebben. Daarnaast kan de verkregen wetenschappelijke kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals bij ALS, MS en de ziekte van Parkinson.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot neurodegeneratieve ziekten en diermodellen van deze ziekten. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Daarnaast zijn er subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.

8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van een afwijkende locatie en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.

10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.

11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van de zenuw crush matig ongerief ondervinden. Van het fenotype, het plaatsen en vervangen van

de minipomp onder anesthesie en de functionele testen ondervinden de muizen gering ongerief. Naar inziens van de DEC zullen alle dieren echter cumulatief matig ongerief ondervinden. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal een groot aantal dieren een operatie ondergaan waarbij er een minipomp subcutaan geplaatst wordt. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.

13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Muizen hebben een aangeboren immuun systeem vergelijkbaar met de mens. Daarnaast herstellen muizen sneller dan bijvoorbeeld ratten. Hierdoor is het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid. Het gekozen muismodel brengt 3 tot 4 kopieën van het CMT gen tot expressie wat resulteert in een fenotype dat erg lijkt op de ziekte CMT1A in de mens. In deze muizen is er net als in de mens sprake van demyelinisatie, een spontane langzame afbraak van de myelinelaag die in eerste instantie wel volledig is gevormd. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren. Myelinisatie is in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Zo heeft elk dier in het zenuwcrush model zijn eigen interne controle waardoor er geen extra controle groepen nodig zijn. Naar inzien van de DEC is de strategie helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.

16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.

17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate gebruiken. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De zenuwen worden geïsoleerd voor verdere analyse. Dit is van essentieel belang om de experimenten goed te beoordelen en is niet mogelijk zonder het dier te doden. Het doden van de dieren gebeurd volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het directe doel, te weten:
   a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
   b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.
   Met als uiteindelijke doel het verkrijgen van meer inzicht over hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd.
   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
   Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
   Waarden die voor de patiënten (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.
   De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.
   De ziekte van Charcot Marie Tooth (CMT) is een hereditaire motorische en sensorische neuropathie in het perifere zenuwstelsel die resulteert in verlammingen en sensorische storingen bij patiënten. CMT komt bij zeker één op de tienduizend mensen voor. De ernst van het klinische beeld is echter zeer divers. Sommige patiënten komen al op jonge leeftijd in een rolstoel terecht terwijl anderen met dezelfde aandoening op hoge leeftijd alleen meer moeite hebben met lopen of vaker struikelen. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. De DEC acht het verkrijgen van meer inzicht in welke processen een rol spelen bij de afbraak van de myelinelaag van zenuwen van essentieel belang voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën zodat de ziekte een langzamer verloop of een mildere vorm krijgt. Daarnaast kan de verkregen kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals ALS, MS en de ziekte van Parkinson. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ✓ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
     - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
     - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
     - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
     - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
     - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dillema's naar voren gekomen.

1.

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☑ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11800
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7

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

Straat en huisnummer	Meibergdreef [redacted]
Postbus	
Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
IBAN	NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	0 2 0 5 6 6 5 7 4 9
E-mailadres	[redacted]

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

(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum: 01-10-2017
		Einddatum: 01-10-2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Cellular thyroid hormone availability determines neutrophil function during infection.
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Schildklierhormoon is belangrijk voor de functie van witte bloedcellen tijdens infectie.
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC: DEC AMC
		Postadres: Meibergdreef 31
		E-mailadres: [redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

- [x] Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287.00 Lege
- [ ] Wijziging € Lege

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

- [ ] Via een eenmalige incasso
- [x] Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- [x] Projectvoorstel
- [x] Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- [ ] Melding Machtiging
- [ ]

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam
Functie
Plaats
Datum
Handtekening

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum
1.3	Vul de titel van het project in.	Cellular thyroid hormone availability determines neutrophil function during infection.

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- [x] Fundamenteel onderzoek
- [x] 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.

Bacterial infections are very common and a major cause of death. Bacterial infections are associated with altered expression of enzymes that regulate cellular thyroid hormone (TH) availability.
The thyroid gland produces the prohormone thyroxine (T4) and, to a lesser extent, the biologically active TH triiodothyronine (T3). Cellular TH concentrations depend not only on serum TH levels, but also on the activity of TH converting enzymes (deiodinases). Type 3 deiodinase (D3) is the major TH inactivating enzyme, as it catalyzes the conversion of both T4 and T3 into inactive forms. [redacted] defense. Neutrophils are the first cells to be recruited to the site of inflammation and are the most abundant type of blood leukocyte. Upon inflammation and infection, neutrophils from the circulation are recruited to the site of inflammation. Neutrophils are highly specialized cells that have multiple microbial killing mechanisms at their disposal. The three main killing mechanisms utilized by neutrophils are degranulation, the production of reactive oxygen species (ROS) using the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase system and the generation of neutrophil extracellular traps (NETs). NETs consist of a web-like structure of chromatin and bactericidal proteins and can then trap and kill extracellular pathogens. NETosis is highly regulated and eventually results in the death of the neutrophil. In severe bacterial infections clinical outcome is determined by the ability of neutrophils to kill pathogens. Defects in the killing of microorganisms enhances susceptibility to infection.

[redacted] function. In contrast, preliminary work showed that [redacted] displayed reduced bacterial load in the spleen compared to WT counterparts following *S. pneumoniae* infection (unpublished). These preliminary results suggest a significant role for type 3 deiodinase in neutrophil function, the mechanism involved is however incompletely understood and it's also unclear if type 3 deiodinase (and thus altered TH availability) contributes to host defense and recovery.

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?

We hypothesize that intracellular thyroid hormone availability determines neutrophil function during infection. This project aims to answer two research questions:

1)Does altered thyroid hormone availability in the neutrophil result in altered bacterial clearance capacity of the host?

2)What is the effect of altered thyroid hormone availability in the neutrophil on neutrophil-specific function and transcriptome?

This project expects to have the following impact:

A better understanding of the role of neutrophil-specific thyroid hormone action in cellular pathways and/or mechanisms common to the pathogenesis of bacterial sepsis. Animal studies will identify the underlying cellular and molecular basis of the functional role of thyroid hormone in the neutrophil.

With regard to the hypothesis investigated: by now [redacted] has been clearly demonstrated in human and mouse neutrophils. In addition, our preliminary results indicate a functional role (unpublished data). However, the underlying mechanism has not been studied yet. We aim to do this via analyzing the functional aspects of neutrophils and the neutrophil-specific transcriptome.

The animal experiments proposed contain no major risks, as we have ample experience with the techniques described and the targeted mutant mice are available to us. Our research group has

extensive experience in performing functional assays in primary cells and a track record in molecular thyroidology.

3.3 Belang

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

We hypothesize that cellular thyroid hormone availability determines neutrophil function during infection. If confirmed, this mechanism is extremely relevant for the functional response of neutrophils during bacterial infections in particular in view of the importance of the innate immune response for host defence in Intensive care unit (ICU) patients. The outcome of this project increases our knowledge about the innate immune response during bacterial infection (scientific relevance) but is also likely to lead to novel therapeutic intervention strategies. The development of novel therapeutic approaches in septic ICU patients based on increased insight into the pathogenesis of sepsis represents an unmet medical need (social relevance).

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Preliminary work suggests a functional role for reduced intracellular thyroid hormone concentrations in infiltrating neutrophils during infection. The mechanisms involved are however unknown. We have formulated the following aims based on *in vivo* (infection) experiments and *in vitro* (functional assays/transcriptome) in order to study in this project:

a)To determine the effect of altered thyroid hormone availability in the neutrophil on bacterial clearance capacity of the host.

[redacted]

[redacted]

and spleen will be determined. Bacterial outgrowth is a measure for the bacterial killing capacity of the host. Once determined and different compared to WT controls, neutrophils will be used for functional assays and measuring the transcriptome.

This study will determine if host bacterial clearance capacity is regulated by neutrophil thyroid hormone availability.

b)To determine the effect of modulation of thyroid hormone availability in the neutrophil on neutrophil-specific function using bone marrow derived neutrophils.

To determine the effect of altered neutrophil thyroid hormone availability on neutrophil specific functions we will perform apoptosis, MPO activity, NADPH oxidase activity, phagocytosis and chemotaxis assays.

[redacted]

We will use bone marrow derived neutrophils as a representative for blood derived neutrophils because of the fact that the isolation procedure is easier and the yield higher. These cells will be harvested from untreated mice.

c)To determine the effect of modulation of thyroid hormone availability in the neutrophil on transcriptome using bone marrow derived neutrophils.

To identify the key T3-target genes in neutrophils we will use RNAseq analysis to determine the

[redacted]

The experiments will be done with bone marrow derived neutrophils. These cells will be harvested from untreated mice.

***These studies will identify the underlying cellular and molecular basis of the functional role of thyroid hormone availability in the neutrophil*.**

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

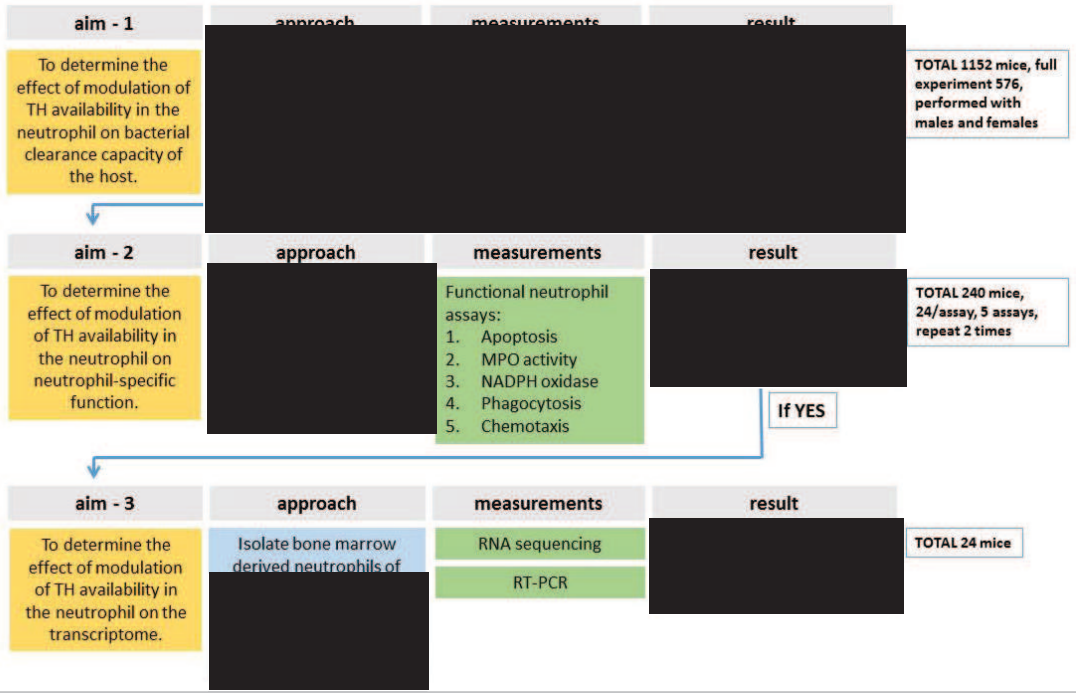
To determine the effect of altered thyroid hormone availability in the neutrophil on bacterial clearance capacity of the host – infection experiments (type dierproef 1)

To determine the effect of modulation of thyroid hormone availability in the neutrophil on neutrophil-specific function and transcriptome (type dierproef 2).

See section 3.4.3

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.

Phase 1: Bacterial killing capacity of the neutrophil is determined by a combination of functional aspects of the cell. The *in vivo* experiments will show whether altering **local** thyroid hormone levels affects the bacterial killing capacity of the host.
Phase 2: Once establish the role of thyroid hormone***, in vitro* experiments** are necessary to determine the functional role, we therefore aim to perform functional assays with bone marrow derived neutrophils from mice that over express [redacted] and mice that do not have [redacted]
Phase 3: Performing **RNA sequencing on bone marrow derived neutrophils** from mice that over [redacted] responsive on local thyroid hormone availability and performing this analysis with mouse neutrophils can therefore result in unraveling the mechanisms involved in altered function.



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Infection experiments with transgenic and WT mice
2	Isolation bone marrow derived neutrophils from transgenic and WT mice
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

3.

Format
Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Schildklierhormoon is belangrijk voor de functie van witte bloedcellen tijdens infectie.
1.2	Looptijd van het project	5 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Ontsteking, schildklierhormoon, witte bloedcel

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- [x] Fundamenteel onderzoek
- [x] Translationeel of toegepast onderzoek
- [ ] Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- [ ] Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- [ ] Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- [ ] Hoger onderwijs of opleiding
- [ ] Forensisch onderzoek
- [ ] Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)

Tijdens een ernstige infectie treden er belangrijke veranderingen op in de stofwisseling van het schildklierhormoon. In het bloed vinden we een lagere concentratie van dat hormoon, en de eiwitten die zorgen voor de productie en de afbraak functioneren anders dan normaal.
Wij denken, op basis van een langlopend onderzoek in ons laboratorium, dat de hoeveelheid schildklierhormoon die beschikbaar is voor een speciale witte bloedcel (neutrofiele granulocyt) belangrijk is bij de afweer tegen infecties.
Met deze serie experimenten willen we aantonen dat als je de hoeveelheid schildklierhormoon in de cel aanpast, de functie van de cel bij een infectie ook verandert. En we willen weten waarom dat zo werkt.

Met deze experimenten willen we de volgende vragen beantwoorden:

		1. Bepaalt de hoeveelheid schildklierhormoon in de neutrofiele granulocyt de ernst van een bacteriële infectie? 2. Wat doet dat hormoon in de neutrofiele granulocyt? 3. Op welke processen in de cel heeft het schildklierhormoon invloed? Deze serie experimenten hebben als gevolg dat we beter snappen hoe neutrofiele granulocyten werken en op welke processen in de cel schildklierhormoon van invloed is. We hopen in de toekomst de werking van de cel zo te kunnen beïnvloeden dat de infectie sneller geneest.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Wanneer we bovenstaande vragen hebben beantwoord, gaan we nieuwe behandelstrategieën ontwikkelen voor patiënten met een ernstige bacteriële infectie. Dat is extra belangrijk voor patiënten met een bloedvergiftiging op de intensive care, aangezien het sterftecijfer voor bloedvergiftiging nog altijd hoog is.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Er worden ongeveer 1400 transgene muizen gebruikt; dit zijn muizen die zo gefokt zijn dat ze een verandering in hun DNA hebben waardoor ze een specifiek eiwit niet of in grote hoeveelheden maken.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De bacteriële infectie waaraan het merendeel van de muizen (78%) wordt blootgesteld geeft amper klachten; we noemen dit gering ongerief. Dit komt doordat de tijdsduur van de infectie kort is en de muizen nog niet echt ziek zijn wanneer ze afgemaakt worden. De overige muizen (22%) zitten langer in de proef na de infectie en worden daar een beetje ziek van; we noemen dit matig ongerief. Daarnaast worden er ook muizen gebruikt die niet behandeld zijn, omdat we uit deze muizen cellen kunnen isoleren waarmee we proeven doen. Deze cellen worden geïsoleerd uit beenmerg. De dieren die hiervoor gebruikt gaan worden hebben licht ongerief.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het project beschrijft een serie aan experimenten waarbij gestart wordt met infectie-experimenten. Deze experimenten geven het meeste ongerief maar geven wel antwoord op de vraag of schildklierhormoon een rol speelt. Daarna zullen we experimenten doen met witte bloedcellen geïsoleerd uit onbehandelde muizen; dit geeft licht ongerief.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Aan het eind van de proef worden de muizen gedood, omdat organen gebruikt worden voor laboratoriumonerzoek.

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.	Neutrofielen zijn witte bloedcellen en de eerste cellen die bij een infectie die wordt veroorzaakt door een bacterie, geactiveerd worden. Neutrofielen hebben verschillende mechanismen waarmee ze bacteriën doden. We bestuderen dit aan de hand van de bacteriegroei in de long (lokale infectie), milt (infectie verspreidt zich) en bloed (sepsis). Omdat we meerdere organen tegelijk bekijken en de respons in de long het verdere verloop van de infectie beïnvloedt, kunnen deze experimenten niet in een cel-model gedaan kunnen worden.

4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Voor de start van een experiment berekenen we de benodigde muizen met behulp van een statistische test die gebaseerd is op de variatie in de uitkomst. Deze variatie hebben we al vastgesteld middels pilot experimenten. Op deze manier gebruiken we niet te veel dieren.
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 experimenten worden uitgevoerd met zowel mannetjes als vrouwtjes muizen; dit om geen fokoverschot te genereren. De experimenten worden gedaan met muizen die genetisch zo aangepast zijn dat alleen hun witte bloedcellen veranderd zijn. We noemen dit conditionele transgene muizen. In het algemeen levert het gebruik van conditionele transgene muizen een beter resultaat op dan wanneer er gebruikgemaakt wordt van niet-conditionele transgene dieren. Ook is de spreiding in de uitkomstmaat kleiner. Op deze manier kunnen er dus ook minder dieren gebruikt worden.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	We observeren de muizen twee keer per dag en hebben humane eindpunten die we toepassen om erger ongerief te voorkomen. In geval van twijfel raadplegen we de IvD.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 — Type dierproef: Infection experiments with transgenic and WT mice

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het schildklierhormoon inactiverende enzym D3 lijkt een belangrijke rol te spelen in de functie van bepaalde witte bloed cellen (neutrofiele granulocyten). Muizen die geen D3 hebben zijn minder goed in staat bacteriën te doden. We weten echter niet of dit komt omdat er geen D3 aanwezig is in de witte bloedcel of omdat hun schildklierhormoon metabolisme in z'n geheel beïnvloed is. [redacted] onderzoeken of de muizen verschillen in de manier waarop ze een bacteriële infectie ondergaan. [redacted] worden geïnfecteerd met verschillende doses *Streptococcus pneumoniae* en de primaire uitkomst is de hoeveelheid bacteriën in de long, milt en bloed op verschillende tijdstippen na infectie. We kiezen voor een *S. pneumoniae* infectie omdat de respons op deze infectie voornamelijk neutrofiel gemedieerd is, bovendien [redacted] concentraties in de cel. Het meten van TH concentraties in de cel is dus geen primaire uitkomstmaat.

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 testen **3 doseringen *S. pneumoniae*** in de range van 10^4 - 10^5 intranasaal, toegediend onder korte isofluraan anesthesie op **3 verschillende tijdspunten** (t=16, 24 en 40 uur). Aan het eind van het experiment (na 16, 24 en 40h wordt bloed afgenomen en organen uitgenomen, bacterie uitgroei wordt

bepaald in bloed, milt en longen. Pilot experimenten hebben aangetoond dat de ernst van de infectie mogelijk van belang is voor de bijdrage van D3. Met drie doseringen willen we dit testen. De pilots die we gedaan hebben hadden als eindpunt t=40h, we weten niet hoe snel D3 een effect heeft. Dit willen we testen door op verschillende tijdstippen te kijken.

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

Eerdere resultaten hebben laten zien dat er veel variatie zit op het infecteren van muizen (SD is 50%) wat tot uiting komt in de uitgroei in diverse organen. Uitgaande van een effect grootte van 50%, een power van 80% en een α van 5% komen we uit op een groepsgrootte van n=16. [n = 2 * (1.96 + 0.84)^2 * (0.50)^2 / (0.5)^2, n = 15.68 * (0.25 / 0.25) = 16]. De uitgroei wordt uitgedrukt in log cfu/gram orgaan. Afhankelijk van de verdeling wordt er parametrisch of non-parametrisch getoetst.

B. De dieren

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

[redacted]

Alle experimenten zijn in vivo experimenten met transgene muizen en bijbehorend wild type uit eigen fok. Deze muizen zijn door hun genetische make up geschikt om onze experimenten mee te doen. In het geval [redacted] gebruiken aangezien [redacted] We doen de experimenten met zowel mannetjes als vrouwtjes omdat de immuunrespons geslachtsafhankelijk is. De dieren worden gebruikt tussen 8-16 weken, eerdere studies hebben aangetoond dat dit tijdsframe gebruikt kan worden.
De groepsgrootte is n=16. We testen drie doseringen en drie tijdspunten, in totaal 144 muizen per genotype. We hebben 4 genotypes, totaal 576 muizen per compleet experiment (= alle tijdspunten en alle doseringen). **Elk experiment wordt een keer gedaan met zowel mannetjes als vrouwtjes. In totaal geeft dit 1152 muizen.**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
Om te bepalen hoe belangrijk het voor een neutrofiel is om heel veel (D3 knock down) of geen (D3 over-expressie) schildklierhormoon te hebben is het belangrijk om een duidelijke uitkomstmaat te hebben. Neutrofielen zijn de eerste cellen die bij een infectie geactiveerd worden en noodzakelijk voor de ontstekingsrespons. Neutrofielen hebben verschillende mechanismen waarmee ze bacteriën doden. We

monitoren dit aan de hand van de bacterie uitgroei in de long (lokale infectie), milt (infectie verspreidt zich) en bloed (sepsis). Het is daarom dat deze experimenten niet in een cel model gedaan kunnen worden.

Vermindering
We verminderen het aantal dieren tot een minimum gebaseerd op een statistische poweranalyse waarbij we de effect grootte weten vanuit eerdere pilots. Deze pilots zijn oa gedaan op tijdstip 40h maar ook op t=16h. Daarnaast maken we gebruik van cel-specifieke transgene muis modellen, deze zogenaamde conditionele muizen hebben als voordeel dat de modificatie alleen aanwezig is in de cel van interesse (in ons geval de neutrofiel). Op deze manier heb je geen last van effecten van de modificatie op andere orgaansystemen wat de uitkomst kan beïnvloeden omdat het daardoor onzeker blijft of je interventie een effect heeft (en er dus meer proeven gedaan moeten worden).

Verfijning
We nemen verscheidene maatregelen om onze experimenten te verfijnen. We laten de dieren minimaal een week acclimatiseren in de proefopstelling teneinde stress te verminderen. Daarnaast worden ze in een groep gehuisvest. Voor dat deze serie experimenten wordt uitgevoerd checken we [redacted] granulocyt. Deze moet > 90% zijn.

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

We monitoren het welzijn van onze dieren twee keer per dag gedurende het experiment aan de hand van de volgende criteria: piloerectie, alertheid, gedrag, lichaamshouding.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

x 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?

x 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.

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

We inoculeren onder kortdurende anesthesie en ook de hartpunctie wordt onder algehele verdoving gedaan. De infectie zelf leidt ook tot ongerief maar aangezien ontstekingsremmers als pijnbestrijding de infectie beïnvloeden en dus het experiment kunnen we dit niet geven. Pijnbestrijding op zich doet bovendien niets aan het gevoel van ziekzijn.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Intranasale inoculatie onder kortdurende anesthesie: gering ongerief.
Algeheel ziek voelen, longontsteking, mogelijk voor sommige muizen kortademig, tgv de *S. pneumoniae* infectie, afhankelijk van de bacterieconcentratie en de duur zal dit gering zijn bij lage concentratie en korte duur en matig bij hoge concentratie en lange duur van de infectie.
Anaesthesie voor het doden van de dieren is gering ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De anesthesie toediening, *S. pneumoniae* infectie in de longen.

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

Anesthesie bij intranasale toediening van de bacterie suspensie, anaesthesie voorafgaand aan hartpunctie en twee maal daagse controle om HEPs toe te kunnen passen als het ongerief ernstig zou worden

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als HEP worden de volgende criteria aangehouden, lichaamshouding, bolle rug, inactief, piloerectie, isolatie van de groep. Lichaamsgewicht wordt bijgehouden maar dit is alleen relevant bij tijdstip t=40h. Indien gewichtsafname >15% tussen 24 en 40 uur is, worden de muizen gedood.

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

Van de 1152 dieren die geïnfecteerd worden krijgt 1/3 de hoogste dosis. Een derde daarvan zit 40h in de proef (=128 dieren, 11%). Ik verwacht op basis van eerdere experimenten dat minder dan 10% van die groep vraagt om het toepassen van HEP. Van de totale hoeveelheid dieren dus < 1%.

K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief voor lage en midden bacterie dosis voor alle tijdstippen. Licht ongerief voor hoogste bacterie-dosis kort tijdstip (= 78%) en matig ongerief voor hoogste bacterie dosis t=24 en 40h (= 22%).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

xJa > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
Organanen worden gebruikt voor metingen
Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
x Ja

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	AMC
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Isolation bone marrow derived neutrophils from transgenic and WT mic

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het schildklierhormoon inactiverende enzym D3 lijkt een belangrijke rol te spelen in de functie van bepaalde witte bloed cellen (neutrofiele granulocyten). D3 is een enzym dat schildklierhormoon (T3 en T4) afbreekt en bepaalt daardoor de hoeveelheid schildklierhormoon in de cel. Neutrofielen zijn witte bloedcellen die belangrijk zijn bij het bestrijden van een infectie. Ze leven kort en zijn makkelijk te activeren. [redacted] isoleren uit het beenmerg en er vervolgens functionele in vitro testen (apoptosis, MPO activity, NADPH oxidase activiteit, fagocytose en chemotaxis = uitkomstmaat) mee doen. Daarnaast willen we kijken welke genen worden beïnvloedt tijdens activatie en of de hoeveelheid schildklierhormoon in de cel hiervoor bepalend is. Hiervoor gebruiken we RNA wat geïsoleerd is uit deze neutrofielen. De uitkomstmaat is een overzicht aan genen die tot expressie komen na activatie van de cel al dan niet met hoge schildklierhormoon concentraties.
Alle in vitro experimenten zullen drie keer worden uitgevoerd. Met deze experimenten krijgen wij belangrijk inzicht in de rol van schildklierhormoon in de verschillende mechanismen die een neutrofiel heeft om bacteriën te bestrijden. Met behulp van RNA sequencing kijken we op moleculair niveau welke genen hierin een rol spelen.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Dieren worden onder CO_2 geëuthanaseerd (< 5 min). Tibia en femurs worden geïsoleerd en beenmerg uitgespoeld Tibia en femurs van 1 muis worden gepoold. Neutrofielen worden geïsoleerd en gebruikt voor *in vitro* testen.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot

een minimum te beperken.

Eerdere resultaten hebben laten zien dat de grootste variatie op de in vitro testen rond de 30% ligt (SD=30%). Uitgaande van een effect grootte van 50%, een power van 80% en een α van 5% komen we uit op een groepsgrootte van n=6. [n = 2 * (1.96 + 0.84)^2 * (0.30)^2 / (0.5)^2, n = 15.68 * (0.16 / 0.25) = 5,6]. Pilots hebben laten zien dat deze groepsgrootte voldoende is.

B. De dieren

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

[redacted]

Alle experimenten worden gedaan met geïsoleerde neutrofielen uit beenmerg van transgene muizen en bijbehorend wild type (mannetjes en vrouwtjes). De muizen worden door ons zelf gefokt en zijn door hun genetische make up geschikt om onze experimenten mee te doen. In het geval [redacted] muizen kunnen we zowel homozygote als heterozygote muizen gebruiken aangezien is aangetoond dat de [redacted]. De dieren worden gebruikt tussen 8-20 weken, eerdere studies hebben aangetoond dit tijdsframe gebruikt kan worden. We doen 5 functionele *in vitro testen*, n=6 per groep, 4 groepen. Per test dus 24 muizen, van elke muis worden de cellen met en zonder stimulus gebruikt, per test panel 120 muizen.

Elke functionele test wordt twee keer gedaan. In totaal geeft dit 240 muizen, 60 per fenotype.

Voor RNA sequencing is het gebruikelijk om 6 dieren per groep te nemen. We hebben 4 stammen en alle cellen worden al dan niet geactiveerd (= 2 condities, kan van dezelfde cel-pool). **In totaal komt dat op 24 dieren**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Om te bepalen hoe belangrijk het is voor de neutrofiel [redacted] schildklierhormoon te hebben is het belangrijk om de functionele aspecten van de cel te testen. Neutrofielen zijn de eerste cellen die bij een infectie geactiveerd worden en noodzakelijk voor de ontstekingsrespons. Neutrofielen hebben verschillende mechanismen waarmee ze bacteriën doden. Met behulp van functionele testen gaan we deze mechanismes testen in neutrofielen geïsoleerd uit beenmerg van de verschillende transgene modellen. Neutrofielen zijn erg kwetsbaar en leven maar kort, het is daarom niet mogelijk om met behulp van genetische technieken (CRISP/Cas, siRNA) neutrofielen te modificeren. We zijn daarom aangewezen op de transgene muismodellen die we hebben en waarmee we ook in vivo infectie experimenten doen.

Vermindering
We verminderen het aantal dieren tot een minimum gebaseerd op een statistische poweranalyse waarbij we de effect grootte weten vanuit eerdere pilots. Als blijkt dat we meerdere functionele testen op 1 dag kunnen waardoor we gebruik kunnen maken van de zelfde pool geïsoleerde cellen dan gaan we dat doen. Dit heeft tot gevolg dat er minder muizen nodig zijn.

Verfijning
We nemen verscheidene maatregelen om onze experimenten te verfijnen. We laten de dieren minimaal een week acclimatiseren in de proefopstelling teneinde stress te verminderen. Daarnaast worden ze in een groep gehuisvest. Voor dat deze serie experimenten wordt uitgevoerd checken we de [redacted] granulocyt. Deze moet > 90% zijn.

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

De dieren ondergaan geen behandeling dus er is geen ongerief

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

x 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?

x 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?

x Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

nvt

J. Humane eindpunten

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

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.

licht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Botten worden gebruikt om beenmerg te oogsten

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

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

x Ja

6.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project — Cellular thyroid hormone availability determines neutrophil function during infection

3. Titel van de NTS — Schildklierhormoon is belangrijk voor de functie van witte bloedcellen tijdens infectie

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC — DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon — [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken — 1 juni 2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager nvt
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
   >ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/ een wijziging op een bestaande vergunning~~.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
   >ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
   >nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de rol van intracellulair beschikbaar schildklierhormoon in de neutrofiel in de afweer tegen bacteriën met twee subdoelvragen:
A) Wat is het effect van een veranderde beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel op de capaciteit van de gastheer om bacteriën te verwijderen?

B) Wat is het effect van een veranderde beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel op de functie en het transcriptoom van de neutrofiel?

De subdoelen zijn tijdsafhankelijk en dragen beiden bij aan de hoofddoelstelling. Eerst zal subdoel A behaald worden voordat subvraag B beantwoord zal worden. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van deze onderzoekers met deze technieken, de beschikbaarheid van de muizen met de benodigde mutaties.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
   >nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van de beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel in de afweer tegen bacteriën. Op langere termijn zou dit een bijdrage kunnen leveren aan de ontwikkeling van betere behandelmethoden van septische patiënten op de intensive care afdeling.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.
   Het directe doel (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de rol van beschikbaar schildklierhormoon in neutrofielen op de afweer tegen bacteriën heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het verbeteren van de behandelmethoden van septische patiënten op de intensive care afdeling. Al zal de toepassing van deze behandelmethode in de verre toekomst liggen en niet binnen dit project gehaald worden, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol van beschikbaar schildklierhormoon in de neutrofiel op de afweer tegen bacteriën, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate patiënten met sepsis.
De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood worden om de weefsels te verzamelen of doordat de blootstelling aan de bacterie de dieren ziek zal maken. Dit kan stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren. De onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.
De kennis die verkregen wordt uit dit onderzoek kan bijdragen aan een betere behandeling van sepsis.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

   Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

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

   De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.
   De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met de beschreven technieken. De benodigde muislijnen zijn beschikbaar voor deze groep.

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

   Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. Eerst zal bepaald worden of een verlaagde beschikbaarheid van schildklierhormoon in neutrofielen *in vivo* zal leiden tot een verhoogde afweer tegen bacteriën. Indien dit het geval blijkt te zijn, zal het onderliggende mechanisme verder onderzocht worden. Hiertoe zullen *in vitro* functionele bepalingen met neutrofielen uitgevoerd worden en zal het transcriptoom bepaald worden. Dit Go/No Go moment is een logische strategie, waardoor onnodig proefdiergebruik kan worden voorkomen.

Welzijn dieren

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

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

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

    Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*.

    Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Het ongerief in het in vitro model is licht omdat de dieren (n=360) zonder voorafgaande behandeling worden opgeofferd waarna de weefsels verwijderd worden voor verder onderzoek. Het ongerief van de *in vivo* proeven wordt veroorzaakt door een bacteriële infectie met *Streptococcus pneumoniae.* Het ongerief hangt af van de gekozen dosis en het gekozen tijdstip van doden na de blootstelling aan de bacterie. Dieren die opgeofferd worden op het korte tijdstip na blootstelling ondergaan licht ongerief (Binnen dit infectiemodel betreft dit 78% van de muizen). De muizen die behandeld worden met de hoogste bacteriedosis en op de latere tijdspunten (t=24 en 40) worden gedood ondergaan matig ongerief (22% binnen infectiemodel). Voor de gehele aanvraag zullen 1416 muizen gebruikt worden waarvan er 82% licht ongerief ondergaan en 18% matig.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).*

    De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen.

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

    De criteria voor een humaan eindpunt zijn goed gedefinieerd. Uiterlijke kenmerken van ongerief (lichaamshouding, niet-sociaal gedrag, opstaande vacht) en verlies van lichaamsgewicht zijn reden om dieren vroegtijdig uit de proef te nemen. Er wordt uit ervaring geschat dat <1% dit eindpunt zou halen. Het betreft de dieren die geïnfecteerd worden met de hoogste dosis. Een derde daarvan zit 40 uur in de proef (=128 dieren, 11%). Van deze subgroep verwachten de aanvragers op basis van eerdere experimenten dat minder dan 10% vraagt om het toepassen van HEP.

    3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
    De aanvrager geeft aan dat het onderzoeken van het *in vivo* effect van een verlaagde beschikbaarheid van het schildklierhormoon in neutrofielen op de afweer tegen bacteriën alleen onderzocht kan worden in een proefdier omdat het een complexe

interactie betreft tussen de longen (lokale infectie), de milt (infectie verspreidt zich) en het bloed (sepsis). Deze vraagstelling kan daarom niet verricht worden in een proefdiervrij alternatief.
In de tweede bijlage worden geïsoleerde neutrofielen verder onderzocht. Neutrofielen leven maar kort en zijn erg kwetsbaar, het is daarom niet mogelijk om met CRISPR/cas9 of siRNA neutrofielen te modificeren. De aanvrager kan daarom alleen neutrofielen gebruiken uit de transgene muislijnen die ook voor de *in vivo* proeven gedaan worden. Er wordt getracht om zoveel mogelijk dieren uit de *in vivo* proeven te gebruiken als donor voor de *in vitro* proeven. Gezien de vraagstellingen van de aanvrager vindt de DEC dat de aanvrager voldoende heeft onderbouwd dat voor dit onderzoek geen proefdiervrij alternatief voor handen is.

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

    Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden en met waarden uit eerdere proeven. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor de verschillende subdoelen. Daarnaast voorkómen de verschillende Go/No Go momenten dat er onnodig dieren gebruikt zullen worden.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
    De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:
    1) de proeven uitgevoerd worden in een redelijk kort tijdsbestek (maximaal t=40);
    2) er genetisch gemodificeerde lijnen gebruikt worden die verder geen behandeling hoeven te ondergaan voor het benodigde fenotype;
    3) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven zo optimaal uit te voeren.

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

    Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).*
    Er wordt in dit onderzoek in gelijke mate gebruik gemaakt van mannelijke en vrouwelijke dieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van

toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).*

De dieren worden in het kader van het onderzoek gedood voor verdere analyse van de weefsels.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
nvt

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).*
Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol die de beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel in de afweer tegen bacteriën(in het bijzonder de Streptococcus pneumoniae), het gebruik van 1416 muizen en het lichte tot matige ongerief dat deze muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het onderzoeken van de rol van de mate van beschikbaarheid van schildklierhormoon op de afweer tegen bacteriën, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit (toekomstige) patiënten met sepsis. Deze kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan een therapie gericht op neutrofielen en/of het intracellulaire schildklierhormoon.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood worden om de weefsels te verzamelen of doordat de blootstelling aan de bacterie de dieren ziek zal maken. Dit kan stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en mogelijke patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die

dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van sepsis. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 1416 muizen licht tot matig ongerief ondergaan doordat ze gedood worden voor het gebruik van hun weefsels of doordat ze ziek worden door een bacteriële infectie, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de rol van de beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel in de afweer tegen bacteriën. De toepassing van deze inzichten in de kliniek zal echter nog jaren op zich laten wachten en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over de rol van beschikbaar schildklierhormoon in neutrofielen in de afweer tegen bacteriën, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het lichte tot matige ongerief van maximaal 1416 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Schildklierhormoon is belangrijk voor de functie van witte bloedcellen tijdens infectie

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol die de beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel in de afweer tegen bacteriën speelt, het gebruik van 1416 muizen en het lichte tot matige ongerief dat ze zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In dit onderzoek zal eerst onderzocht worden of een verlaagde schildklierhormoon beschikbaarheid in neutrofielen een effect heeft op de afweer tegen bacteriën. Als dit zo blijkt te zijn, wordt het onderliggende mechanisme verder onderzocht. De uitkomsten van dit onderzoek zullen bij kunnen dragen aan de ontwikkeling van een therapie die gericht is op de schildklierhormoon beschikbaarheid binnen de neutrofiel voor patiënten met sepsis.

Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. In vivo wordt onderzocht of een verlaagde beschikbaarheid van schildklierhormoon in de neutrofiel een verschil laat zien in bacteriële load in de longen, milt en bloed. Afhankelijk van de gekozen bacteriedosis en het tijdstip van doden ondergaan de dieren licht tot matig ongerief. De dieren die gedood worden voor het verzamelen van neutrofielen ondergaan licht ongerief. Er is geen proefdiervrij alternatief voor het verkrijgen van neutrofielen, omdat ze zeer kwetsbaar zijn en kort leven. Een genetische modificatie *in vitro* is daardoor niet mogelijk. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en bevat verschillende Go/No Go momenten. Deze Go/No Go stap borgt dat alleen dan het onderliggende mechanisme onderzocht wordt als er daadwerkelijk sprake is van een verschil in de afweer tegen

bacteriën. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat het onderliggende mechanisme ex-vivo wordt bestudeerd. De dieren ondergaan voor dit deel van het onderzoek geen voorafgaande behandeling.
De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door groepsgrootte berekeningen te verrichten met data verkregen uit eerdere experimenten. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
      ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
      ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
      ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Er zijn geen knelpunten of dilemma’s naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten...., een acceptabel alternatief is, omdat....."

C12. Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

C18. Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke

dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft."

Voorbeeld B: "Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan."

D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): "De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt."

E. Advies

E2. Voorbeeld: "Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn....."

7.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef [redacted]
1105 AZ AMSTERDAM
[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002017946

Bijlagen
2

Datum 15 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 augustus 2017. Het gaat om uw project "Cellular thyroid hormone avalability determines neutophil function during infection". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017946. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
15 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017946

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
15 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017946

Gegevens aanvrager

Uw gegevens	
Deelnemersnummer NVWA:	11800
Naam instelling of organisatie:	Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	343362777
Straat en huisnummer:	Meibergdreef [redacted]
Postcode en plaats:	1105 AZ AMSTERDAM
IBAN:	NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	AMC Amsterdam

Over uw aanvraag

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

Datum:
15 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017946

Over uw project

Geplande startdatum:	1 oktober 2017
Geplande einddatum:	1 oktober 2022
Titel project:	Cellular thyroid hormone avalability determines neutophil function during infection
Titel niet-technische samenvatting:	Schildklierhormoon is belangrijk voor de functie van witte bloedcellen tijdens infectie
Naam DEC:	DEC AMC
Postadres DEC:	Meibergdreef 31, 1105 AZ Amsterdam
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.287,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	15 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002017946

Bijlagen
2

Datum 15 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 15 augustus 2017
Vervaldatum: 14 september 2017
Factuurnummer: [redacted]
Ordernummer: Kostenplaatsnummer: [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002017946	€ 1.287,00

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

8.

[redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 23 augustus 2017 10:21
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: AVD118002017946: aanvullende informatie

Geachte [redacted]
Op 15 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD118002017946. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.
- U gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. U geeft aan dat de immuunrespons geslachtsafhankelijk is. Om die reden worden mannelijke en vrouwelijke dieren in bijlage 3.4.4.1. niet samen in 1 experiment getest. Dit leidt tot een verdubbeling van het benodigd aantal dieren. U maakt echter niet inzichtelijk waarom het noodzakelijk is om alle proeven met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren. Kunt u, in het kader van vermindering, aangeven of het mogelijk is te starten met een van beide geslachten, terwijl alleen de belangrijkste uitkomsten in het andere geslacht worden geverifieerd?
- U geeft in de NTS aan hoeveel dieren er ongeveer worden gebruikt. Hier dient u echter het werkelijk aangevraagde aantal dieren te vermelden.

Opsturen binnen veertien dagen
De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 24 augustus. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.
Meer informatie
Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)
-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 15 augustus 2017 13:57
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: OntvangstBevestiging 1946
Geachte [redacted]
Deze brief is ook per post verzonden.
Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Academisch Medisch Centrum

Universiteit van Amsterdam

Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

[redacted]

Amsterdam, 28-8-2017
Betreft aanvraag AVD118002017946

Beste [redacted]

Bij deze mijn antwoorden naar aanleiding van vragen:

- U gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. U geeft aan dat de immuunrespons geslachtsafhankelijk is. Om die reden worden mannelijke en vrouwelijke dieren in bijlage 3.4.4.1. niet samen in 1 experiment getest. Dit leidt tot een verdubbeling van het benodigd aantal dieren. U maakt echter niet inzichtelijk waarom het noodzakelijk is om alle proeven met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren. Kunt u, in het kader van vermindering, aangeven of het mogelijk is te starten met een van beide geslachten, terwijl alleen de belangrijkste uitkomsten in het andere geslacht worden geverifieerd?

Pilot infectie experimenten waarop deze aanvraag is gebaseerd is uitgevoerd met vrouwtjes muizen. We hebben ook gezien dat er mogelijk een geslachtsafhankelijk effect is wat betreft de functie van de neutrofiel en de rol van schildklierklierhormoon. Om dit in kaart te brengen willen we de experimenten in elk geval graag met vrouwtjes doen. In het kader van de vermindering kan ik me wel vinden in de aanpassing dat we de infectie experimenten met vrouwtjes gaan doen, dit scheelt 576 muizen.

- U geeft in de NTS aan hoeveel dieren er ongeveer worden gebruikt. Hier dient u echter het werkelijk aangevraagde aantal dieren te vermelden.

Een infectie-experiment kost 576 dieren. Bijlage 2 gaat met 264 dieren, in totaal 840.

Ik hoop dat ik de vragen naar tevredenheid heb beantwoord.

Hartelijke groet, [redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 — Type dierproef: Infection experiments with transgenic and WT mice

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het schildklierhormoon inactiverende enzym D3 lijkt een belangrijke rol te spelen in de functie van bepaalde witte bloed cellen (neutrofiele granulocyten). Muizen die geen D3 hebben zijn minder goed in staat bacteriën te doden. We weten echter niet of dit komt omdat er geen D3 aanwezig is in de witte bloedcel of omdat hun schildklierhormoon metabolisme in z'n geheel beïnvloed is. Recent zijn er transgene muizen beschikbaar [redacted] worden geïnfecteerd met verschillende doses *Streptococcus pneumoniae* en de primaire uitkomst is de hoeveelheid bacteriën in de long, milt en bloed op verschillende tijdstippen na infectie. We kiezen voor een *S. pneumoniae* infectie omdat de respons op deze infectie voornamelijk neutrofiel gemedieerd is, bovendien hebben we in dit model laten zien dat D3 hoog tot expressie komt in de neutrofiel tijdens de infectie. Het model ([redacted]) is gebruikt in een andere setting en we weten dat het manipuleren van D3 leidt tot sterk veranderde TH concentraties in de cel. Het meten van TH concentraties in de cel is dus geen primaire uitkomstmaat.

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 testen **3 doseringen *S. pneumoniae*** in de range van 10^4 - 10^5 intranasaal, toegediend onder korte isofluraan anesthesie op **3 verschillende tijdspunten** (t=16, 24 en 40 uur). Aan het eind van het experiment (na 16, 24 en 40h wordt bloed afgenomen en organen uitgenomen, bacterie uitgroei wordt

bepaald in bloed, milt en longen. Pilot experimenten in vrouwtjes hebben aangetoond dat de ernst van de infectie mogelijk van belang is voor de bijdrage van D3. Met drie doseringen willen we dit testen. De pilots die we gedaan hebben hadden als eindpunt t=40h, we weten niet hoe snel D3 een effect heeft. Dit willen we testen door op verschillende tijdstippen te kijken.

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

Eerdere resultaten hebben laten zien dat er veel variatie zit op het infecteren van muizen (SD is 50%) wat tot uiting komt in de uitgroei in diverse organen. Uitgaande van een effect grootte van 50%, een power van 80% en een α van 5% komen we uit op een groepsgrootte van n=16. [n = 2 * (1.96 + 0.84)^2 * (0.50)^2 / (0.5)^2, n = 15.68 * (0.25 / 0.25) = 16]. De uitgroei wordt uitgedrukt in log cfu/gram orgaan. Afhankelijk van de verdeling wordt er parametrisch of non-parametrisch getoetst.

B. De dieren

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

Alle experimenten zijn in vivo experimenten met transgene muizen en bijbehorend wild type uit eigen fok. Deze muizen zijn door hun genetische make up geschikt om onze experimenten mee te doen. In het geval van de over-expressie muizen kunnen we zowel homozygote als heterozygote muizen gebruiken aangezien is aangetoond dat de [redacted]. We doen de experimenten met vrouwtjes omdat de immuunrespons geslachtsafhankelijk is en de eerdere experimenten waarop deze aanvraag gebaseerd is ook met vrouwtjes zijn gedaan. De dieren worden gebruikt tussen 8-16 weken, eerdere studies hebben aangetoond dat dit tijdsframe gebruikt kan worden.
De groepsgrootte is n=16. We testen drie doseringen en drie tijdspunten in vrouwtjes muizen, in totaal 144 muizen per genotype. We hebben 4 genotypes, totaal 576 muizen per compleet experiment (= alle tijdspunten en alle doseringen). **In totaal geeft dit 576 muizen.**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

x Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
Om te bepalen hoe belangrijk het voor een neutrofiel is om heel veel (D3 knock down) of geen (D3 over-expressie) schildklierhormoon te hebben is het belangrijk om een duidelijke uitkomstmaat te hebben. Neutrofielen zijn de eerste cellen die bij een infectie geactiveerd worden en noodzakelijk voor de ontstekingsrespons. Neutrofielen hebben verschillende mechanismen waarmee ze bacteriën doden. We monitoren dit aan de hand van de bacterie uitgroei in de long (lokale infectie), milt (infectie verspreidt zich) en bloed (sepsis). Het is daarom dat deze experimenten niet in een cel model gedaan kunnen worden.

Vermindering
We verminderen het aantal dieren tot een minimum gebaseerd op een statistische poweranalyse waarbij we de effect grootte weten vanuit eerdere pilots. Deze pilots zijn oa gedaan op tijdstip 40h maar ook op t=16h. Daarnaast maken we gebruik van cel-specifieke transgene muis modellen, deze zogenaamde conditionele muizen hebben als voordeel dat de modificatie alleen aanwezig is in de cel van interesse (in ons geval de neutrofiel). Op deze manier heb je geen last van effecten van de modificatie op andere orgaansystemen wat de uitkomst kan beïnvloeden omdat het daardoor onzeker blijft of je interventie een effect heeft (en er dus meer proeven gedaan moeten worden).

Verfijning
We nemen verscheidene maatregelen om onze experimenten te verfijnen. We laten de dieren minimaal een week acclimatiseren in de proefopstelling teneinde stress te verminderen. Daarnaast worden ze in een groep gehuisvest. Voor dat deze serie experimenten wordt uitgevoerd checken we de eliminatie van D3 in de granulocyt. Deze moet > 90% zijn.

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

We monitoren het welzijn van onze dieren twee keer per dag gedurende het experiment aan de hand van de volgende criteria: piloerectie, alertheid, gedrag, lichaamshouding.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

x 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?

x 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.

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

We inoculeren onder kortdurende anesthesie en ook de hartpunctie wordt onder algehele verdoving gedaan. De infectie zelf leidt ook tot ongerief maar aangezien ontstekingsremmers als pijnbestrijding de infectie beïnvloeden en dus het experiment kunnen we dit niet geven. Pijnbestrijding op zich doet bovendien niets aan het gevoel van ziekzijn.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Intranasale inoculatie onder kortdurende anesthesie: gering ongerief.
Algeheel ziek voelen, longontsteking, mogelijk voor sommige muizen kortademig, tgv de *S. pneumoniae* infectie, afhankelijk van de bacterieconcentratie en de duur zal dit gering zijn bij lage concentratie en korte duur en matig bij hoge concentratie en lange duur van de infectie.
Anaesthesie voor het doden van de dieren is gering ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De anesthesie toediening, *S. pneumoniae* infectie in de longen.

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

Anesthesie bij intranasale toediening van de bacterie suspensie, anaesthesie voorafgaand aan hartpunctie en twee maal daagse controle om HEPs toe te kunnen passen als het ongerief ernstig zou worden

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Als HEP worden de volgende criteria aangehouden, lichaamshouding, bolle rug, inactief, piloerectie, isolatie van de groep. Lichaamsgewicht wordt bijgehouden maar dit is alleen relevant bij tijdstip t=40h. Indien gewichtsafname >15% tussen 24 en 40 uur is, worden de muizen gedood.

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

Van de 576 dieren die geïnfecteerd worden krijgt 1/3 de hoogste dosis. Een derde daarvan zit 40h in de proef (=64 dieren, 11%). Ik verwacht op basis van eerdere experimenten dat minder dan 10% van die groep vraagt om het toepassen van HEP. Van de totale hoeveelheid dieren dus < 1%.

K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief voor lage en midden bacterie dosis voor alle tijdstippen. Licht ongerief voor hoogste bacterie-dosis kort tijdstip (= 78%) en matig ongerief voor hoogste bacterie dosis t=24 en 40h (= 22%).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Organen worden gebruikt voor metingen

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
x Ja

11.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM
[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002017946
Bijlagen
1

Datum 11 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 15 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cellular thyroid hormone avalability determines neutophil function during infection" met aanvraagnummer AVD118002017946. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus hebben wij u een vraag gesteld over het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren en de NTS. Bij uw antwoord heeft u een aangepaste bijlage dierproeven meegestuurd waarin het benodigd aantal dieren omlaag is gebracht. Wij kunnen ons vinden in uw aanpassing.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Cellular thyroid hormone avalability determines neutophil function during infection" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning voor niet langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017946

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017946

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Cellular thyroid hormone avalability determines neutophil function during infection" met aanvraagnummer AVD118002017946, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is .
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 september 3017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 augustus 2017, ontvangen op 15 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Infection experiments with transgenic and WT mice				
	Muizen (Mus musculus) /	576	22% Matig 78% Licht	
3.4.4.2. Isolation bone marrow derived neutrophils from transgenic and WT mice				
	Muizen (Mus musculus) /	264	100% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD118002017946

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

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

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

Aanvraagnummer:
AVD118002017946

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.

AVD 118002017 1185

1.

Centrale Commissie Dierproeven

22 AUG. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11800
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Acedemisch Medisch Centrum	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	343362777	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31
Postbus		
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam
IBAN	NL68TABO0136166741	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	AMC Crediteurenadministratie	

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]
Functie	[redacted]
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	[redacted]
E-mailadres	[redacted]

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

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]
Functie	Postdoc
Afdeling	[redacted], Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
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]
Functie	PhD candidate
Afdeling	[redacted], Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
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 - 10 - 2017
Einddatum	1 - 10 - 2022

3.2 Wat is de titel van het project?

Murine pancreatic islet isolation

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

Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie

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

Naam DEC	Dierexperimentencommissie AMC
Postadres	Meibergdreef 31, 1105AZ Amsterdam
E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Amsterdam
Datum	18 - 8 - 2017
Handtekening	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	AMC
1.3	Provide the title of the project.	Murine pancreatic islet isolation

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.

Effect of bacterial translocation on the endocrine function of the pancreatic islets

Type 2 diabetes (T2D) has risen to epidemic proportions resulting in major morbidity and mortality. Approximately one in eleven adults has diabetes nowadays, making it to one of the largest global health emergencies of the 21st century [1]. In addition to insulin resistance, impaired function and destruction

of the insulin-producing beta cells form a direct cause for hyperglycaemia and T2D [2]. Therapies that may halt or reverse this detrimental process are warranted. An inflammatory process in pancreatic islets, with infiltration of immune cells, is present in T2D; however, the primary trigger for this inflammatory response remains unknown. This inflammatory process and a subsequent loss of function of these cells has important consequences for the development of T2D since this cell cluster (islets of *Langerhans* or pancreatic islets) include the insulin producing beta cells (approx. 80% of the islet cells) [3].
Recently, (diet-induced) alterations in intestinal microbiota composition were shown to associate with T2D; notably more potentially pathogenic bacteria/microorganism are increased in T2D [redacted] unpublished data). In addition, T2D patients show increased translocation of detrimental bacteria from the intestinal lumen into surrounding tissues ('leaky gut'), previously shown to induce adipose tissue inflammation and dysfunction [4]. Here, we hypothesize that increased bacterial translocation or translocation of bacterial components (metabolites or LPS) to the pancreas induces inflammation and beta cell dysfunction in T2D.
We will investigate this hypothesis first by identifying micro-organismal DNA in pancreatic tissue harvested during pancreatectomy in patients with and without T2D. The identified microorganisms with highest pathogenicity will be (an)aerobically cultured and subsequently used in *in vitro* incubation experiments using freshly isolated murine pancreatic islets. Islet physiology will be assessed *via* beta-cell function (e.g. insulin expression and release) and inflammatory gene and protein marker expression. We expect that this study will render a novel and unique approach to relate the effect of translocation of intestinal bacteria or bacterial components (e.g. metabolites or LPS) to islet inflammation and beta-cell dysfunction in T2D.

[redacted] Preliminary studies suggest that incubation of freshly isolated murine pancreatic islets [redacted] reduce insulin secretion during glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (Figure 1). Importantly, no changes in insulin secretion were observed in a pure beta-cell line (INS1E, data not shown). Since this pure cell line does not harbour any immune cells, we expect that immune cells mediate the effects observed in freshly isolated pancreatic islets [5]. To assess our research question, this project therefore depends on the routine isolation of freshly isolated murine pancreatic islets. In the scope of this proposal, we will investigate the direct effect of bacteria or bacterial components (e.g. metabolites or LPS) on pancreatic islet function, with a focus on insulin-producing beta cells. Insulin-related marker expression and inflammatory marker expression will help us understand how bacteria or bacterial components (e.g. metabolites or LPS) influence beta cell function and diabetes development.
The importance of identified markers will be verified in islet isolated from diet-induced obese (insulin resistant) mice and in different knock-out mouse models. By using these models we hope to find genes or proteins that could be targeted for novel treatment strategies. Further, we will use islets from diet-induced obesity (DIO) mice to find potential differences between obese and lean mice since T2D is highly associated with high body weight and we expect that islets from DIO mice respond differently to bacterial treatment [1]. Last, we aim to identify different bacterial components, which are able to induce an inflammatory response and reduce insulin secretion. Lipopolysaccharide (LPS) is an example of a bacterial component that induces an inflammatory response. LPS is increased in the circulation of diabetic and obese subjects compared to healthy lean subjects [6]. Using proteomics approaches, we aim to identify bacterial components or metabolites that are able to induce an inflammatory response and reduce insulin secretion from beta cells. Results obtained from the proposed studies will help us to develop new treatment strategies to target harmful bacteria or bacterial components and prevent or restore loss of beta cell function.

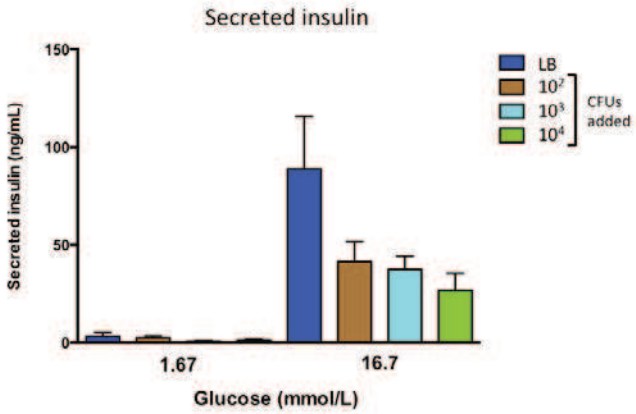


Figure 1: Incubation of freshly isolated murine pancreatic islets [redacted] *reduces insulin secretion in vitro (Abbr. Colony forming units, CFUs).*

References
[1] International Diabetes Federation, "IDF Diabetes Atlas," Seventh edition, 2015.
[2] S. E. Kahn, M. E. Cooper, and S. Del Prato, "Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future," Lancet, vol. 383, no. 9922, pp. 1068–1083, Mar. 2014.
[3] M. Y. Donath, "Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 6, pp. 465–476, Jun. 2014.
[4] J. Amar *et al.*, "Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment," *EMBO Mol. Med.*, vol. 3, no. 9, pp. 559–572, Sep. 2011.
[5] B. Calderon et al., "The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages," Journal of Experimental Medicine, vol. 212, no. 10, pp. 1497–1512, Sep. 2015.
[6] M. Trøseid, T. K. Nestvold, K. Rudi, H. Thoresen, E. W. Nielsen, and K. T. Lappegård, "Plasma Lipopolysaccharide Is Closely Associated With Glycemic Control and Abdominal Obesity," Diabetes Care, vol. 36, no. 11, pp. 3627–3632, Nov. 2013.

3.2 Purpose

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

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

The overall aim of this project proposal is to obtain mechanistic insight in the role of the gut microbiota in development of T2D. We will specifically focus on the **effect of (translocating) bacteria or bacterial components on pancreatic islet cells**.

What is the effect of (translocating) bacteria on the pancreatic beta cell function (insulin secretion)?
What is the effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islet cells?

Main objective: To gain mechanistic understanding of the effect the gut microbiota on development of T2D, with particular focus on bacteria-mediated effects on endocrine function of pancreatic islets.

Sub goal 1: The effect of (translocating) bacteria on the insulin activity (release and expression) of pancreatic islets.

Sub goal 2: The effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islets.

Sub goal 3: The effect of (translocating) bacteria on immune cells of pancreatic islets.

Sub goal 4: The effect of (translocating) bacteria on the protein-cell interaction in pancreatic islets.

Sub goal 5: The role of genes identified in sub goal 1 and 2 in the response to (translocating) bacteria with the aid of gene knock-out mice models.

Sub goal 6: The effect of (translocating) bacteria on pancreatic islets in diet induced obesity (DIO) mice.

Sub goal 7: Identification of immunogenic compounds (eg LPS or bacterial metabolites) from (translocating) bacteria, which induce the inflammatory response and subsequently, the insulin secretion loss.

Feasibility

[redacted] Within our research group, department and network of collaborators, there is sufficient knowledge on successful execution of experiments with animal models enabling us to successfully test our hypotheses and conclusively address our research questions. [redacted] we were able to learn the methodology of the islet isolation and other related procedures (gene expression analysis, histology, pancreatic macrophage isolation, etc.). The present project is in line with one of the main research objectives in our department (microbiota and metabolic disease development). In-house knowledge of mouse physiology is present through different Article 9 and Article 12 holders. Our laboratories in the [redacted] at the AMC have all the necessary equipment to perform the islet isolation (microscope, cell culture room with laminar flow hood and appropriate cell culture incubators). Several technicians with sufficient background in cell culture experience will assist us. Further, we have several collaborators [redacted] to grow sufficient amount of various bacterial strains (aerobic as well as anaerobic). In the near future, we will have all equipment in our own department.

The project proposal is feasible within the suggested 5-year time frame. Mouse numbers for suggested experiments are on average ~16 mice/month for 5 years which is manageable with the manpower we have for the coming 5 years (2 technicians, 2 PhD students, 1 postdoc).

References

[redacted]

3.3 Relevance

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

Scientific relevance

Type 2 diabetes (T2D) has risen to epidemic proportions resulting in major morbidity and mortality. In addition to insulin resistance, impaired function and destruction of the insulin-producing beta cells are a direct cause for hyperglycaemia and T2D. While the role of inflammation of Langerhans' islets is largely established in T2D, the initial trigger that ignites this process is unknown. Translocating bacteria or bacterial components from the intestinal lumen are discussed as a potential trigger of this inflammatory response. Here, we aim to obtain mechanistic insights in the inflammatory process and the related (insulin) function loss.

Social relevance

Preliminary results indicate that translocating bacteria are affecting the insulin response in obesity and T2D. Our research may generate opportunities towards the development of novel therapies aimed at beta-cell preservation. Identification and depletion of potentially pathogenic bacteria may help to prevent

and treat metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. Our results will help to generate new treatment strategies.

3.4 Research strategy

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

The overall project strategy will be top-down. [redacted] In this study, we will isolate and sequence bacterial DNA from human pancreatic biopsies of T2D subjects. Strains or groups of bacteria that correlate with T2D will be selected for *ex vivo* treatment of freshly isolated pancreatic islets.
We will isolate murine pancreatic islets and incubate this cell complex with (heat-inactivated) bacteria. A glucose stimulated insulin secretion (GSIS) test will tell us if there are differences in the insulin secretion and expression in the treatment group vs control (sub goal 1). An alternative bacterium (not present in human pancreatic biopsies) will be used to confirm the uniqueness of the effect of the bacterium of interest in inducing beta-cell function loss (according to Koch`s postulates; for animal number calculations, see appendix).

Main objective: To gain mechanistic understanding of the effect the gut microbiota on development of T2D, with particular focus on bacteria-mediated effects on endocrine function of pancreatic islets.

Following Go/No-Go decision-making, we will carry out dedicated studies to unravel the mechanism by which the intervention (bacterial treatment) influences metabolic processes of pancreatic islets that are typically deranged in obesity and T2D. We aim to achieve around 20% reduction of insulin secretion after bacterial treatment compared to controls (=Go), which is comparable to the development of T2D in human [1]. If insulin expression and secretion are not affected during bacterial treatment (=No-Go), no further animals will be used (see Figure 2). According to Koch`s postulate, we will choose a bacterial strain that has been identified in human pancreatic biopsies (diabetic vs non-diabetic) and incubate this strain with freshly isolated pancreatic islets (sub goal 1). If we see differences between the treatment and control groups, we will focus on this strain and continue with sub goal 2-4 to assess the role of the immune system on the response of islets to bacteria. Next, we will verify our results (from sub goal 1-3) in different mouse models, including DIO mice and knock-out mice (sub goal 5 and 6). Last, using targeted proteomics, we aim to identify bacterial immunogenic components that can induce an inflammatory response and subsequently an insulin loss of pancreatic islets. These identified compounds can be used to for diagnostic purposes.

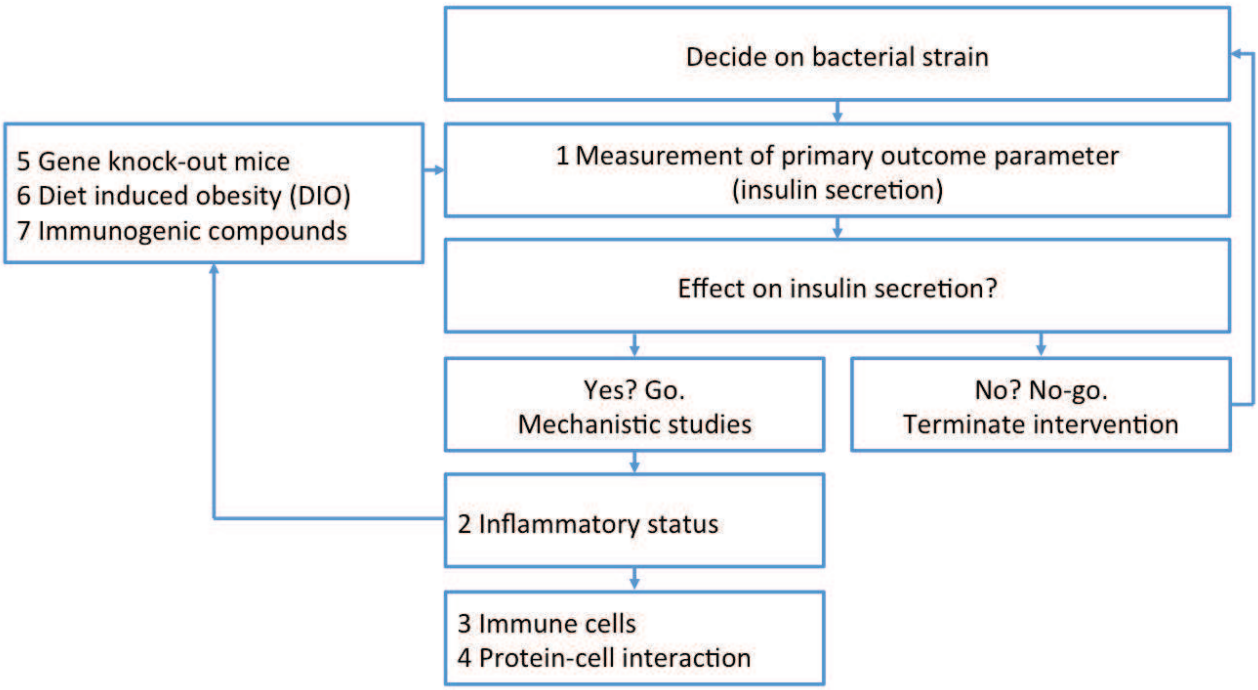


Figure 2: Scheme for Go/No-Go decision making of this proposal.

Sub goal 1: The effect of (translocating) bacteria on the insulin activity (release and expression) of pancreatic islets.

- -Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria and measurement of secreted as well as insulin content during GSIS.
- -Go, if the insulin secretion is around 20% lower in treated samples compared to the controls. Continue with sub goal 2.
- -No-Go, if the insulin secretion is not different from control samples. Choose another bacterial strain from the most abundant strains identified in human pancreatic biopsies or end the project.

Sub goal 2: The effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islets.

- -Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria and measurement of inflammatory marker expression (gene and protein level).
- -Go, if the inflammatory marker expression is around 20% different in treated samples compared to controls (e.g. more pro-inflammatory markers and less anti-inflammatory markers). Continue with sub goal 3.
- -No-Go, if the inflammatory marker expression is not different from control samples. Choose another inflammatory marker or end the project.

Sub goal 3: The effect of (translocating) bacteria on immune cells of pancreatic islets.

- -Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria, followed by immune cell isolation and analysis.
- -Go, if the immune cell type exhibits around a 20% different activation/phenotype in treated samples compared to the control (e.g. more pro-inflammatory macrophages and less anti-inflammatory macrophages). Continue with sub goal 4.
- -No-Go, if the immune cell type does not exhibit a different activation compared to control samples. Choose another immune cell type or end the project.

Sub goal 4: The effect of (translocating) bacteria on the protein-cell interaction in pancreatic islets.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria. Islets will be fixed and analysed *via* immunohistochemistry (e.g. location of immune cells identified in sub goal 3 in relation to insulin producing beta-cells or uptake of heat-inactivated bacteria by islet cells during *in vitro* inoculation). Further, we validate the role of different proteins that we found in sub goal 1 and 2. With these results we complete the mechanistic studies.

Sub goal 5: The role of genes identified in sub goal 1 and 2 in the response to (translocating) bacteria with the aid of gene knock-out mice models.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from different knock-out mice models with (heat-inactivated) bacteria.
- Go, if the insulin secretion is unchanged in treated samples compared to control samples (both knock-out) and different from wild-type treated samples. Continue with experimental setup in sub goal 2 to verify the inflammatory status found in wild-type islets.
- No-Go, if the insulin secretion is different between treated samples and controls (both knock-out) and the same as wild-type treated samples. Choose another knock-out mode according to the findings of sub goal 2 or end the project.

Sub goal 6: The effect of (translocating) bacteria on pancreatic islets in diet induced obesity (DIO) mice.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from DIO mice (C57BL/6 background) with (heat-inactivated) bacteria.
- Go, if the insulin secretion is at least 20% lower in DIO islets compared to lean controls. Continue with experimental setup in sub goal 2 to verify the phenotype from lean mice.
- No-Go, if the insulin secretion from DIO islets is not different from lean controls. Choose another bacterial strain from the most abundant strains identified in human pancreatic biopsies or end the project.

Sub goal 7: Identification of immunogenic compounds from (translocating) bacteria, which induce the inflammatory response and subsequently, the insulin secretion loss.

- Model: Immunogenic compounds will be identified *via* targeted proteomics. Freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 mice will be incubated with an immunogenic compound (such as LPS) from our bacteria from of interested.
- Go, if the insulin secretion is at least 20% lower in treated samples compared to the control and the effect size is 2. Continue with experimental setup in sub goal 2.
- No-Go, if the insulin secretion is not different from control samples. Choose another immunogenic compound or end the project.

References

[1] C. Weyer, C. Bogardus, D. M. Mott, and R. E. Pratley, "The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus," J. Clin. Invest., vol. 104, no. 6, pp. 787–794, Sep. 1999.

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.

Sub goal 1: Insulin activity

Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with different concentrations of (heat-inactivated) bacteria. Different incubation times will show us an acute (1 hour) or chronic effect (72 hours) of bacterial treatment. Insulin will be measured in the media (secretion) and in lysed islet cells (content). RNA as well as proteins will be isolated and analysed for insulin related gene/protein expression (e.g. PDX1, MafA, INS1).

Sub goal 2: Inflammatory status
Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. RNA as well as proteins will be isolated from pancreatic islets and analysed for inflammatory markers (e.g. IL-1b, IL-6, TNF-a).

Sub goal 3: Immune cells
Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. The cell cluster of the pancreatic islets will be dispersed and immune cells will be isolated. Freshly isolated immune cells will be analysed for their inflammatory potential (FACS analysis).

Sub goal 4: Protein-cell interaction
Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. Pancreatic islets will be fixed and stained for proteins/cell markers according to sub goal 1, 2 and 3.

Sub goal 5: Gene knock-out mice
Model: Gene knock-out mice models (e.g. IL-1b, IL-6, TLR4) will be purchased from commercial suppliers or obtained from collaborators. Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. Insulin will be measured in the media (secretion) and in lysed islet cells (content). Results will be compared to wild-type mice.

Sub goal 6: Diet-induced obese (DIO) (insulin resistant) mice
Model: DIO mice will be purchased from commercial suppliers at an age of 10 to 12 weeks, DIO mice have been fed a special diet to induce obesity and insulin resistance. Incubation of freshly isolated pancreatic islets from DIO mice with (heat-inactivated) bacteria.

Sub goal 7: Immunogenic compounds of target bacteria
Model: Immunogenic compounds of the targeted bacterial strain will be identified *via* targeted proteomics. Freshly isolated pancreatic islets will be incubated an immunogenic compound (such as LPS) and insulin release and expression will be measured in the media as well as the cell lysate.

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

The overall aim and specific focus points in this project are closely related: We could show already that bacterial translocation contributes to the development of obesity and T2D. Data on causality, however, are scarce. We hypothesize that presence of (translocating) bacteria contributes to the development of T2D (loss of insulin secretion). To test that, we will first incubate pancreatic islets with dominant bacterial strains, previously identified in human pancreatic biopsies (sub goal 1). If we find (significant) differences between treated and control samples, we will go on with sub goal 2 to investigate the mechanism in detail (gene and protein expression of inflammatory as well as insulin related markers). Next, we will relate these markers to specific cell types in the cell cluster of a pancreatic islet, which we will isolate and investigate their phenotype (sub goal 3). Previous experiments could show already that bacterial treatment does not affect the insulin activity of pure beta cell lines (INS1E). Therefore, we expect that the insulin loss in pancreatic beta cells is mediated through immune cells (see 3.1). To study the direct effect of different cells (especially immune cells) on insulin producing beta cells, we will perform immunohistochemistry to relate their locations to each other (sub goal 4). To highlight the importance of markers identified in sub goals 1-4, we will purchase knock-out mice models and perform the same tests as in sub goal 1 and 2 (effect of bacteria on pancreatic islets with specific gene knockout on insulin secretion and inflammatory status). We expect to reduce or even diminish the effect of bacteria on the insulin secretion while having an important gene knocked out. Understanding the mechanism behind the effect of bacteria on pancreatic islet function will help us to design new strategies for the treatment of gut microbiota mediated T2D development.
T2D is highly related to obesity. Here, we hypothesize that bacterial treatment *ex vivo* will have a stronger effect on islets from DIO mice than lean mice (sub goal 6). To confirm the mechanism found in

lean mice, we will perform sub goal 1 and 2 on diet induce obesity (DIO) mice. These findings will help us to understand the different mechanism in lean and obese subjects.
Lipopolysaccharide (LPS) is an important compound already used in various studies to show the immunogenic effect of Gram-negative bacteria on different cell types. Several studies showed that this compound is increased in obese and diabetic subjects compared to lean controls.
Here, we expect to find more bacteria-related substances that can induce an inflammatory response in pancreatic islets, which may lead to a function loss (loss of insulin expression and secretion). With the aid of a targeted proteomics approach (sub goal 7), we will identify potential targets of our bacteria of interest and incubate them with freshly isolated islets (sub goal 1 and 2). This will help us to develop new markers for the gut microbiota mediated T2D development and to find new prevention strategies.

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	[redacted]
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	AMC
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 — Type of animal procedure: Murine islet isolation

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Mice will be anesthetized and euthanized *via* cervical dislocation. Pancreatic islets will be isolated, cultured and incubated with different compounds (heat-inactivated bacteria or bacterial components such as LPS). Insulin secretion will be measured after glucose stimulated insulin secretion (GSIS; sub goal 1). Gene and protein expression will analysed after treatment (sub goal 2). Further, the cell cluster of the pancreatic islets will be dispersed and the immune cell activity (sub goal 3) as well as proximity to the insulin producing beta cells (sub goal 4) will be further investigated. Findings from these experiments will be validated in gene-knock out mice models (sub goal 5) and diet induced obesity (DIO) mice (sub goal 6). Further, we will identify in the next 5 years immunogenic compounds of the bacteria of interest with the aid of a targeted proteomics approach to assess their impact on the pancreatic islet function (sub goal 7).

Primary outcome parameter: Insulin secretion of pancreatic islets after bacterial treatment.

Secondary outcome parameters: Gene and protein expression (inflammatory markers and insulin related genes) as well as immune cell activity.

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

Procedure and *J*ustification (*J*)

Anaesthesia prior to sacrifice for islet isolation (sub goal 1-7)
Mice will be anesthetized prior to the sacrifice (cervical dislocation) and pancreatic islet isolation.

Removal of the pancreas (sub goal 1-7)
The abdomen will be opened and a collagenase solution will be injection into the pancreas *via* the common bile duct. The extended organ will be excised and placed in a sterile tube for further applications. **(J)** Collagenase has to be injected to release pancreatic islet cells from exocrine tissue.

Diet induced obesity (DIO) (sub goal 6)
DIO mice will be purchased from authorized animal suppliers and islets will be isolated. **(J)** An obese phenotype is a prerequisite for T2D. We expect that pancreatic islet cells respond differently to bacterial presence.

Knock-out mice models (sub goal 5)
Different knockout mice will be purchased from authorized suppliers or from collaborators. Islet will be isolated. **(J)** To further investigate mechanistic findings (sub goal 1-4), we need to confirm these findings in gene knockout mouse models.

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

One mouse yields approximately 200-400 islets [12]. The response of islets to glucose depends on the size of islets. Only a subset of islets has comparable size (medium sized islets). Therefore, we use 200 islets per mouse for our calculations since not all islets can be used for the experiments (approx. 150 medium sized islets of 200 islets used for calculations). For a glucose stimulated insulin secretion (GSIS), 1 mouse is necessary for a condition in triplicates (e.g. treatment or control group; 50 islets per well = 150 islets total).

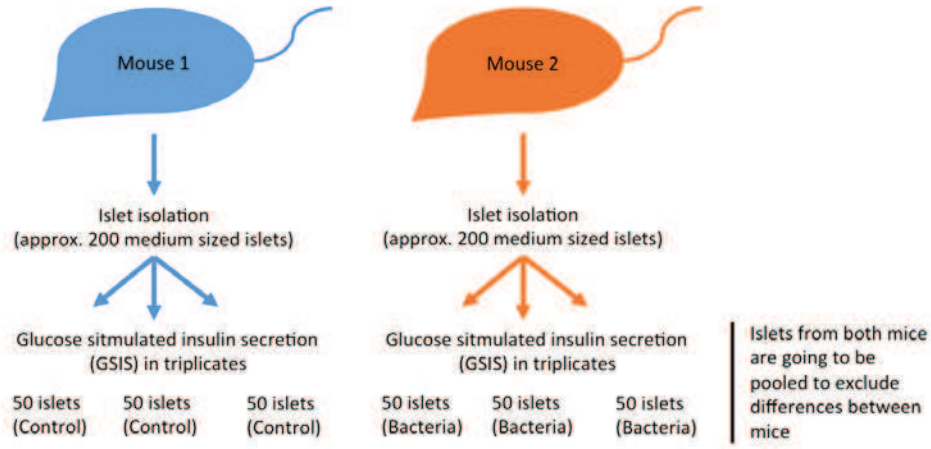


Figure 1: Scheme to clarify the experimental setup of a glucose stimulated insulin secretion (GSIS) and power calculation.

Sub goal 1: The effect of (translocating) bacteria on the insulin activity of pancreatic islets.
We expect to test 10 different bacteria or bacterial components in the course of 5 years.

*5 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 100*

Power analysis performed suggests using 5 mice to achieve significance. Group size (based on unpublished data; insulin secretion of control islets vs. 10^2 CFU heat-inactivated bacteria treated islets): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 54.38, standard deviation: 26.9

(control) and 9.7 (treatment).

Sub goal 2: The effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islets.

*4 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 80*

Power analysis performed suggests using 4 mice to achieve significance. Group size (based on Ins2 expression in Amyot *et al* 2012 [1]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 11, standard deviation: 4 (control) and 1 (treatment).

Sub goal 3: The effect of (translocating) bacteria on immune cells of pancreatic islets.

*9 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 180*

Power analysis performed suggests performing 9 mice to achieve significance. Group size (based on IL-6 release of pancreas resident macrophages in Nackiewicz *et al*, 2014 [8]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 1.7, standard deviation: 0.8 (control) and 1.4 (treatment).

Sub goal 4: The effect of (translocating) bacteria on the protein-cell interaction in pancreatic islets.

*10 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) *10 (different bacteria or bacterial components) = 200*

Power analysis performed suggests using 10 mice to achieve significance. Group size (based on macrophage infiltration in pancreatic islets of lean or obese mice in Agudo *et al*, 2012 [9]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 0.45, standard deviation: 0.02 (lean) and 0.43 (obese).

Sub goal 5: The role of previously identified genes (sub goal 2) in the response to (translocating) bacteria with the aid of gene knockout mice models.

*3 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 60*

Power analysis performed suggests using around 3 mice per treatment to achieve recommended minimal amount of animals. Group size (based on insulin secretion from pancreatic islets in wild-type or $TLR4^{-/-}$ mice; Li *et al*, 2012 [10]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 1.4, standard deviation: 0.14 (lean) and 0.28 (obese).

Sub goal 6: The effect of (translocating) bacteria on pancreatic islets on DIO treated mice.

*11 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 220*

Power analysis performed suggests using 11 mice to achieve significance. Group size (based on IL-6 secretion in Ehses et al, 2007 [7]; lean mice vs. diet induced obesity mice): Significance value: 0.05, power of the study: 80%, difference in means: 950, standard deviation: 670 (control) and 782 (treatment).

Sub goal 7: Identification of immunogenic compounds from (translocating) bacteria, which induce the inflammatory response and subsequently, the insulin secretion loss.

*5 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 100*

Power analysis performed suggests using 5 mice to achieve significance. Group size (based on unpublished data; insulin secretion of control islets vs. 10^2 CFU heat-inactivated bacteria treated islets): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 54.38, standard deviation: 26.9 (control) and 9.7 (treatment).

Animal number according to power analysis: 940 mice (approx. 15.7 animals per month over a time period of 5 years).

References

[1] J. Amyot, M. Semache, M. Ferdaoussi, G. Fontés, and V. Poitout, "Lipopolysaccharides Impair Insulin Gene Expression in Isolated Islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF-κB Signalling," PLoS One, vol. 7, no. 4, Apr. 2012.
[2] T. Vatanen et al., "Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans," Cell, vol. 165, no. 4, pp. 842–853, May 2016.
[3] Q. Zhang et al., "Cell coupling in mouse pancreatic β-cells measured in intact islets of Langerhans," Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, vol. 366, no. 1880, pp. 3503–3523, Oct. 2008.
[4] E. R. Unanue, "Macrophages in endocrine glands with emphasis on pancreatic islets," Microbiol Spectr, vol. 4, no. 6, Dec. 2016.
[5] U. S. Pettersson, T. B. Waldén, P.-O. Carlsson, L. Jansson, and M. Phillipson, "Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue," PLOS ONE, vol. 7, no. 9, p. e46057, Sep. 2012.
[6] D. Nackiewicz et al., "TLR2/6 and TLR4-activated macrophages contribute to islet inflammation and impair beta cell insulin gene expression via IL-1 and IL-6," Diabetologia, vol. 57, no. 8, pp. 1645–1654, Aug. 2014.
[7] J. A. Ehses et al., "Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2 Diabetes," Diabetes, vol. 56, no. 9, pp. 2356–2370, Sep. 2007.
[8] S. Choudhury, S. Ghosh, P. Gupta, S. Mukherjee, and S. Chattopadhyay, "Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF-κB and SAPK/JNK pathway," Free Radic. Res., vol. 49, no. 11, pp. 1371–1383, 2015.
[9] J. Agudo et al., "Vascular Endothelial Growth Factor–Mediated Islet Hypervascularization and Inflammation Contribute to Progressive Reduction of β-Cell Mass," Diabetes, vol. 61, no. 11, pp. 2851–2861, Nov. 2012.
[10] J. Li et al., "TLR4 is required for the obesity-induced pancreatic beta cell dysfunction," Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai), vol. 45, no. 12, pp. 1030–1038, Dec. 2013.
[11] S. Nishimura et al., "Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation," Cell Metab., Oct. 2013.
[12] J. D. Carter, S. B. Dula, K. L. Corbin, R. Wu, and C. S. Nunemaker, "A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment," Biol Proced Online, vol. 11, pp. 3–31, Dec. 2009.

B. The animals

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

Species: mouse
Origin: commercial providers, collaborating research groups
Age: Range 4 to 12 weeks.
Gender: The experiments described in this proposal will only make use of male animals. Our main objective is to study the role of gut bacteria in development of type 2 diabetes. In order to do so, one of the requirements is to have a validated model (=male mice) with known drivers for disease development. Only under these conditions, it will be possible to study the additional role of bacteria. Since female mice generally respond differently to diet-induced obesity compared to males (e.g. female mice seem to be fairly protected from (adipose tissue) inflammation, glucose intolerance, hyperinsulinemia and islet hypertrophy), female animals are a less suitable model system [1]. It not within the scope of our proposed research to include the optimization and standardization of new animal models, new diets, new disease phenotypes, new measurement techniques and new surgeries. Use of female mice would require validation, optimization and standardization of all procedures and thus

exponentially increase the mouse numbers needed for this project proposal.

We will start with wild-type C57BL/6 mice to confirm our findings from our collaborators that bacterial treatment is decreasing insulin secretion *in vitro*, but only in a complex cell structure such as pancreatic islets (with immune cells). After confirmation and investigation of molecular mechanisms (gene and protein expression), we will use genetically modified mice such as Toll-like receptor (TLR) knockout mice to confirm the role of specific molecular markers. We will use mice at different ages, but prefer to use them at an age of 3 months to ensure a good yield and quality of islets.

References

[1] U. S. Pettersson, T. B. Waldén, P.-O. Carlsson, L. Jansson, and M. Phillipson, "Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue," PLOS ONE, vol. 7, no. 9, p. e46057, Sep. 2012.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: Cell lines do not have sufficient complexity for what we are aiming to measure (no immune cells). Pancreatic organoids do not have immune cells and are very expensive to maintain [1]. Human islets are very expensive to obtain and are rarely available. There is no way to obtain healthy pancreatic tissue slices from human since the pancreas is very deeply embedded in the abdomen and is susceptible to an inflammatory process after performing an incision. Therefore, we depend on murine islets.

Reduction: Using 'Go' and 'No-go' criteria, we will proceed (or not) with in-depth follow-up experiments and decide which experiments are required and which ones can be skipped. This allows for development of dedicated experiments thereby reducing the number of mice required to answer the scientific questions. Well-trained, experienced technicians, postdocs and PhD-students will carry out all procedures. This will significantly reduce failure of experimental procedures (and thereby loss of animals). Last, our power analysis suggests already the optimal number of animals to achieve significance. Experiments from different sections of this proposal are going to be combined if possible to reduce mouse numbers.

Refinement: Mice will be acclimatized prior to the experiments and will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting. All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and PhD-students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals.

References

[1] P. H. Dedhia, N. Bertaux-Skeirik, Y. Zavros, and J. R. Spence, "Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease," Gastroenterology, vol. 150, no. 5, pp. 1098–1112, May 2016.

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

Mice will be housed in groups, young littermate mice will be housed and kept together from day of arrival in animal facility. We will work with male mice that sometimes fight. However, we do not expect to see much fighting since we will keep these mice only for a short period of time (up to 2 weeks) until they are going to be sacrificed for islet isolation. Nevertheless, this will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting. There will be only mild discomfort for the animals since they will be anesthetized prior to the procedure. All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and PhD-students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals. Inexperienced participants to the studies will receive training with animals intended for educational purposes (oefenprotocol) prior to joining the experiments.
We do not propose experiments that require materials that are damaging to the environment. We will make sure to order bacteria and compounds in amounts sufficient for the suggested experiments thereby reducing waste. Any leftover materials will be disposed of according to health and safety guidelines.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☒ No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There will be no adverse effects since the animals will be euthanized before the procedure. We will make sure that animals are housed in groups and with enough enrichment. The discomfort level is `mild` since the animals will sacrificed prior islet isolation.

Explain why these effects may emerge.

As mentioned, no such effects.

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

As mentioned, no adverse effects.

J. Humane endpoints

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

☒ No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is `mild` for wild-type animals since the animals will be euthanized before islet isolation. Mild discomfort is expected for DIO mice. The discomfort of gene knock-out mice depends on the mice model.

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.

Mice have to be killed before the islets isolation procedure.

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

4.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project Murine pancreatic islet isolation

3. Titel van de NTS Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken 18 mei 2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager nvt

- Datum
- Plaats
- Aantal aanwezige DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager
- Gestelde vraag / vragen
- Verstrekt(e) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager nvt
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
   >ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/ een wijziging op een bestaande vergunning~~.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
   >ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
   >nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de rol van darm microbiota op de ontwikkeling van diabetes type 2 met de focus op de migratie van bacteriën naar eilandjes van Langerhans in de pancreas) met twee subdoelvragen:
A) Wat is het effect van (verplaatsende) bacteriën op de beta cel functie in de pancreas (de insuline productie)?;
B) Wat is het effect van (verplaatsende) bacteriën op de ontstekingsstatus van de eilandjes van Langerhans?

De subdoelen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Eerst zal subdoel A behaald worden voordat subvraag B beantwoord zal worden. Subdoel A bestaat op zijn beurt weer uit verschillende subdoelen: Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van deze onderzoekers met deze onderzoekslijn en de eerdere samenwerking met andere onderzoekers om de isolatie van eilandjes van Langerhans te leren.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
   >nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van bacteriën op het verslechteren van de beta cel functie in de pancreas en naar de inflammatoire status van de pancreas. Het onderzoek is ook translationeel omdat deze rol van bacteriën in een model voor diabetes type 2 bestudeerd wordt.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.
   Het directe doel (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de rol van darm microbiota op de ontwikkeling van diabetes type 2 met de focus op de migratie van deze bacteriën naar eilandjes van Langerhans in de pancreas) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het verbeteren van de behandelmethoden voor diabetes type 2). Al zal de toepassing van deze behandelmethode in de verre toekomst liggen en niet binnen dit project gehaald worden, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol van verplaatsende darmbacteriën naar de eilandjes van Langerhans, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten met diabetes type 2.
Deze kennis zou voor (toekomstige) patiënten met diabetes type 2 kunnen bijdragen aan een betere therapie. De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood worden om de weefsels te verzamelen. De behandeling vindt echter geheel *in vitro* plaats en zal verder geen stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

   Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

   Proefopzet en haalbaarheid

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

   De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.
   De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met deze onderzoekslijn. Ze hebben ervaring met het beschreven obesitasmodel (DIO muizen) en hebben de eilandjes isolatie techniek reeds operationeel.

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

   Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. Het gehele project wordt uitgevoerd met eilandjes van Langerhans die geïsoleerd worden uit de pancreas, waarna in-vitro de verschillende onderzoeksvragen onderzocht zullen worden. Er zijn verschillende Go/No Go momenten opgenomen waarbij een logische strategie wordt aangehouden. De onderliggende mechanismen of mogelijkheden voor interventie worden pas onderzocht als eerder gebleken is dat de bacterie stam inderdaad de insuline productie onderdrukt.

   Welzijn dieren

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

   ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
   ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
   ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
   ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
   ☐ Zwerfdieren (10h)
   ☐ Hergebruik (1e, lid 2)
   ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen. De cervicale dislocatie wordt uitgevoerd onder anesthesie (ook al zou dit niet eens noodzakelijk zijn aangezien de muizen minder dan 150 gram wegen).

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

    Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*.

    Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. De meeste dieren zullen "licht" ongerief ondergaan omdat de dieren gedood worden om de eilandjes te kunnen isoleren. De DIO muizen die gebruikt worden ondergaan een licht ongerief door hun fenotype. Van de verschillende KO muizen zou er mogelijk ongerief op kunnen treden door het fenotype, maar dit is nog onbekend.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).*

    De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen.

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

    Er is geen humaan eindpunt gedefinieerd. De enige handeling aan het dier is het doden om de eilandjes te verkrijgen. Er wordt daarom niet verwacht dat er zich situaties voor kunnen doen die het definiëren van een humaan eindpunt nodig is. De DEC vindt deze inschatting juist.

    3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
    De aanvrager geeft aan dat cellijnen of pancreas organoids niet geschikt zijn door het ontbreken van immuuncellen. Humane eilandjes van Langerhans zijn zeer moeilijk te verkrijgen. Gezien de vraagstellingen van de aanvrager vindt de DEC het aannemelijk dat de proeven daarom in muizen eilandjes verricht moeten worden.

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

Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor de verschillende subdoelen. Daarnaast voorkomen de verschillende Go/No Go momenten dat er onnodig dieren gebruikt zullen worden.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:
1) de proeven uitgevoerd worden op geïsoleerde eilandjes van Langerhans en de dieren zelf geen handelingen ondergaan;
2) de DIO muizen of KO muizen die mogelijk ongerief ondergaan door hun fenotype pas gebruikt worden als er een duidelijke aanwijzing is uit eerdere proeven dat deze vraagstelling relevant is;
3) de muizen worden gedood (cervicale dislocatie) onder anesthesie.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).*
Er wordt in dit onderzoek alleen gebruik gemaakt van mannelijke dieren. De aanvrager onderbouwt deze keus wetenschappelijk in voldoende mate. Het diabetesmodel wordt in mannelijke dieren uitgevoerd omdat de vrouwelijke muizen minder gevoelig zijn voor het ontwikkelen van ontsteking in het vetweefsel, glucose intolerantie, hyperinsulinemia en hypertrofie van de eilandjes. De mannelijke muis is daarom veel beter geschikt voor dit onderzoek.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).*

De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood om de eilandjes van Langerhans te isoleren.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

nvt

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).*
Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol die de translocatie van bacteriën naar de pancreas kan spelen in het ontstaan van diabetes het gebruik van 940 muizen en het lichte ongerief dat deze muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het onderzoeken van de rol van migrerende bacteriën naar de pancreas op het ontstaan van diabetes type 2, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit (toekomstige) patiënten met diabetes type 2. Deze kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan een hierop gerichte therapie.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood worden om de weefsels te verzamelen. De behandeling vindt echter geheel in vitro plaats en zal verder geen stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en mogelijke patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling of in het voorkomen van de ontwikkeling van diabetes type 2. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 940 muizen licht ongerief ondergaan doordat ze gedood worden voor het gebruik van hun weefsels of doordat hun fenotype licht ongerief veroorzaakt, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de rol die naar de pancreas migrerende bacteriën kunnen spelen in het ontstaan van diabetes type 2. De toepassing van deze inzichten zal echter nog jaren

op zich laten wachten en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over de rol van migrerende bacteriën, die in humane weefsels al zijn aangetoond, in het ontstaan van diabetes type 2, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het lichte ongerief van maximaal 940 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol die migrerende bacteriën van de darm naar de pancreas spelen in het ontstaan van diabetes type 2, het lichte ongerief van maximaal 940 muizen, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In dit onderzoek zal eerst onderzocht worden of een bacteriestam de insuline productie in bètacellen kan onderdrukken. Als dit zo blijkt te zijn, wordt het onderliggende mechanisme verder onderzocht. Ook wordt bekeken of een interventie de productie kan herstellen en of bètacellen uit muizen met obesitas een andere respons laten zien. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een therapie die gericht is deze invasie van bacteriën in de pancreas. Een dergelijke therapie of vaccinatie zou de grote ziektelast die diabetes meebrengt voor de patiënt en de maatschappij terug kunnen dringen. De DEC onderschrijft het nut van het onderzoeken van deze mogelijkheid.

Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het lichte ongerief dat de muizen ondergaan, wordt veroorzaakt doordat ze gedood worden voor het verzamelen van hun weefsels (eilandjes van Langerhans), of in het geval van de diabetes (DIO) muis of een KO muis kan ook het fenotype van de muis een licht ongerief veroorzaken. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en bevat verschillende Go/No Go momenten. Deze Go/No Go stap borgt dat de vervolgvragen in een geschikte experimentele conditie worden uitgevoerd en voorkomt onnodig proefdiergebruik indien de bacterie geen effect zou hebben op de insuline productie. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De DEC onderschrijft de mening van de aanvrager dat er geen proefdiervrije alternatieven zijn voor het onderzoeken van deze vraagstellingen. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de dieren zelf geen behandeling ondergaan met bacteriën. De dieren worden enkel gebruikt als donor voor de benodigde eilandjes van Langerhans. De blootstelling aan bacteriën wordt vervolgens *in vitro* uitgevoerd in geïsoleerde eilandjes van Langerhans.
De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te

behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door groepsgrootte berekeningen te verrichten met data verkregen uit eerdere experimenten. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
      ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
      ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
      ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Er zijn geen knelpunten of dilemma’s naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen

aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten...., een acceptabel alternatief is, omdat....."

C12. Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

C18. Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft."

Voorbeeld B: "Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan."

D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): "De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt."

E. Advies

E2. Voorbeeld: "Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn....."

5.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171185
Bijlagen
2

Datum 21 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 augustus 2017. Het gaat om uw project "Murine pancreatic islet isolation". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020171185. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11800
Naam instelling of organisatie:	Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	343362777
Straat en huisnummer:	Meibergdreef 31
Postcode en plaats:	11O5 AZ AMSTERDAM
IBAN:	NL68TAB00136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	AMC Crediteurenadministratie

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	Postdoc
Afdeling:	[redacted], Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam:	[redacted]
Functie:	PhD candidate
Afdeling:	[redacted], Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?	[x] 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 oktober 2017
Geplande einddatum:	1 oktober 2022
Titel project:	Murine pancreatic islet isolation
Titel niet-technische samenvatting:	Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie
Naam DEC:	Dierexperimentencommissie AMC
Postadres DEC:	Meibergdreef 31, 11O5AZ Amsterdam
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	18 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171185

Bijlagen
2

Datum 21 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 21 augustus 2017
Vervaldatum: 20 september 2017
Factuurnummer: 171185
Ordernummer: OVV: [redacted]
Kostenplaatsnummer [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1180020171185	€ 935,00

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

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171185
Bijlagen
1

Datum 11 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 17 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Murine pancreatic islet isolation" met aanvraagnummer AVD1180020171185. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Murine pancreatic islet isolation" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Murine pancreatic islet isolation" met aanvraagnummer AVD1180020171185, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted] Voor de uitvoering van het project is PhD candidate verantwoordelijk.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 mei 2017, ontvangen op 17 oktober 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Murine islet isolation				
	Muizen (Mus musculus) /	940	100% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

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.

1287

Centrale Commissie Dierproeven

1.

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

11 JULI 2017

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11800
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	343362777
Straat en huisnummer	Meibergdreef [redacted]
Postbus	
Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
IBAN	NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

1.6	*(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.	(Titel) Naam en voorletters	☐ 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 - 1 - 2018
		Einddatum	31 - 12 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het genereren, saneren en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen ten behoeve van biomedisch onderzoek	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC AMC
		Postadres	Meibergdreef 31
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035,00 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	[redacted]
Plaats	Amsterdam
Datum	10 - 07 - 2017
Handtekening	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Academisch Medisch Centrum (AMC), Amsterdam
1.3	Provide the title of the project.	Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains.

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

- [X] Basic research
- [X] Translational or applied research
- [ ] Regulatory use or routine production
- [ ] Research into environmental protection in the interest of human or
- [ ] Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- [ ] Higher education or training
- [ ] Forensic enquiries
- [ ] Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The mouse has proved to be an important animal model for studying the role of genetic and environmental factors in human disease and development in an intact organism. In the last decades, disease modeling in genetically modified (GM) mice has become increasingly important and has resulted

in major steps forward in our understanding of the molecular basis of a broad array of human diseases and development. Many researchers in our institute depend on the availability of novel genetically engineered mouse models (GEMMs) to address the important questions in their field. Therefore, in 1996, our Transgenic Facility was established that nowadays has matured into a facility that has the skills and know-how to efficiently generate custom-made GM mice using the latest technologies. The AMC Transgenic Facility serves only internal clients.

The AMC Transgenic Facility provides three key services:

- Generation of GM mouse strains.
- Cryopreservation of GM mouse strains via freezing of sperm or embryos.
- Sanitation of GM mouse strains (starting from either life stock or frozen embryos or sperm) that are required in our institute but were already established elsewhere.

The AMC Transgenic Facility has over twenty years of experience in these three main services and has experienced personnel that is able to perform all procedures in the most efficient manner using the lowest number of animals. It applies state-of-the-art techniques that allow for the generation of genetically modified mouse strains that are optimally suited to address the research questions of the client. Also, the facility has a focus on process optimization and new technologies, particularly those that can lead to a reduction in the number of experimental animals or a reduction in the level of discomfort to the animals. These are tested and when successful implemented in the production process.

Historical perspective
During 2015 and 2016 the animal research institute that houses the AMC Transgenic Facility was temporarily closed for reconstruction and modernization. Currently the facility is fully operational again.

From 2012 – 2014:

The AMC Transgenic Facility generated on average 17 new GM strains each year, obtained by on average 42 embryo manipulation sessions per year.

There were 67 mouse strains frozen as sperm and 19 mouse strains were frozen as pre-implantation embryo. Cryo-preservation omits breeding of a mouse strain once a project is finished and prevents loss of a mouse strain due to breeding failure or genetic drift. In 2014 cryo-preservation of sperm became the standard method and freezing of embryos will only be performed for mouse lines carrying mutations on multiple alleles. After generation of a GM mouse strain we strongly encourage the investigator to cryopreserve the strain.

Fifty GM mouse strains that were required in our institute but were already established elsewhere were imported in the AMC via sanitation using embryo-transfer. Sanitation is the elimination of pathogen contamination resulting in a clean health status (e.g. specific pathogen free (SPF) according to FELASA). Experimental data obtained from healthy mice is less susceptible to variation between individuals leading to smaller experimental groups and thus to *Reduction*.

3.2 Purpose

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

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

The objective of this proposal is first to ensure accessibility to custom-designed GM mice for researchers at the AMC. Second, the AMC Transgenic Facility strongly encourages investigators to cryopreserve all newly generated GM strains at an early generation to secure the mouse strain, ensure easy distribution, prevent unnecessary breeding of mice and re-derive the mouse strain upon request. Third, GM mouse strains that are required in our institute but were already established elsewhere will not be generated

again but are imported into the facility via embryo transfer (sanitation). Fourth, the facility aims to stay up-to-date with advances that either improve the production process of GM mice or provide improvements to the 3R's in animal testing. Our track record, as is illustrated in section 3.1, shows that we have all the expertise needed to meet the goals that have been set in this project proposal.

3.3 Relevance

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

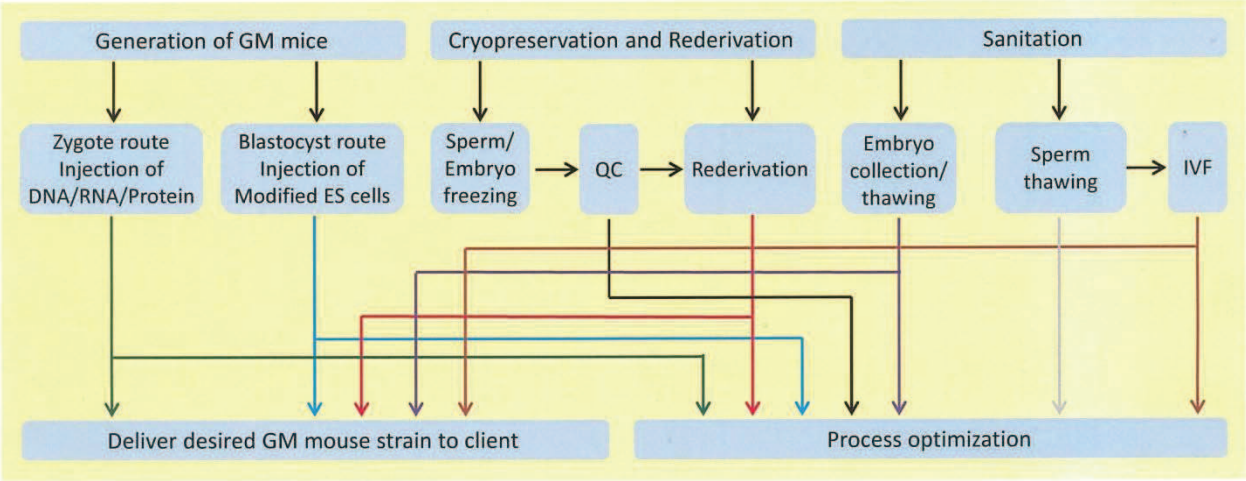
GM mice are essential to biomedical research. Specific alteration of the genome enables us to study gene function, a specific protein or cell type in a mouse in both normal and diseased state and is crucial to advancing knowledge in both basic and translational science. Mouse models of human disease can provide pivotal information on disease progression and treatment options that can ultimately benefit patients. Before a new GM mouse strain is generated approval of the AMC ethical review committee (DEC) is required. This warrants the scientific and/or social relevance of the new strain.

3.4 Research strategy

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

The strategy of the AMC Transgenic Facility is outlined in Figure 1. The facility aims to generate GM mice and provide the cryopreservation, re-derivation and sanitation services to researchers at the AMC. Approximately 5-10% of the total activities are focused on the implementation of improved technologies.

Figure 1: Overview of activities of the AMC Transgenic Facility.



QC: Quality Control; IVF: In Vitro Fertilization.

Generation of GM mice
The prime activity is the generation of GM mice. Two basic routes are currently applied for the generation of GM mice:

The zygote route - This route is based on genetic engineering in fertilized oocytes (zygotes). DNA, RNA or protein is injected into zygotes to modify the genome. After treatment embryos are surgically implanted in the oviduct of a foster mother. The foster mother brings the embryos to term and then suckles and weans the pups. At three weeks of age this 1st generation of mice (F0, founders) is delivered to the customer.

The blastocyst route - This route is based on genetic engineering in cultured Embryonic Stem Cells (ESCs). The genetically modified ESCs are injected into blastocysts, i.e. 3.5 day embryos. The injected blastocysts are implanted in the uterus of a foster mouse. The foster mother brings the embryos to term and then suckles and weans the chimeric pups. At three weeks of age this 1st generation of mice (chimeras) is delivered to the customer.

Cryopreservation program
The cryopreservation program consists of freezing and long-term storage of sperm and embryos and the subsequent re-derivation of mouse strains upon request of the researcher. The cryopreservation program has two branches:

Sperm freezing, quality control (QC) and re-derivation – Sperm of two male mice of the same genotype is collected, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to verify the quality of the batch by performing *In Vitro Fertilization* (IVF). The resulting embryos can be transferred to the oviduct of a foster mother to confirm pregnancy and live birth or to re-derive the strain for delivery to a client.

IVF – Oocytes are harvested from female donor mice, counted, and incubated overnight with thawed sperm.

Embryo freezing, quality control and re-derivation – Early pre-implantation embryos are harvested from female donor mice, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to test the batch by verifying the viability of the embryos upon thawing. Thawed embryos can be cultured *in vitro* and implanted in a foster mother to re-derive the mouse strain.

Sanitation program
The sanitation program consists of obtaining pre-implantation embryos that are washed thoroughly to eliminate pathogens and the subsequent implantation into foster mice. The sanitation program has two branches:

Sanitation starting from embryos – Embryos can be obtained by thawing frozen stock or freshly isolated from female donor mice.

Sanitation starting from frozen sperm – Sperm is thawed and IVF is performed to obtain embryos.

Process optimization
The generation of GM mice is a highly complex and specialized activity. In the transgenic facility this process is closely monitored by calculating the percentages after each experiment in order to identify dips in performance (e.g. plug yield, embryo yield, embryo survival, foster pregnancy, litter size, founders/chimeras). Performance issues are addressed by reviewing procedures, chemicals and equipment to restore and/or optimize the production process. In addition, new technologies are implemented with several goals in mind; to improve the production process, to reduce the number of mice required or to reduce the level of discomfort per mouse. Examples are the implementation of the CRISPR/Cas9 technology (fewer mice required to obtain the desired GM strain due to its efficiency) and the Non-Surgical Embryo Transfer (NSET).

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.

AMC Transgenic Facility distinguishes 5 types of experimental mice:

1) Female donor mouse (for isolation of embryos or oocytes)
2) Fertile stud male
3) Infertile stud male
4) Foster mother
5) GM mouse

Table 1 provides an overview of the types of experimental mice that are required for each part of the strategy.

Table 1. Types of experimental mice required

	Generation of GM mice		Process optimization	Cryopreservation and re-derivation				Sanitation	
	Zygote route	Blastocyst route		Sperm cryo	IVF	Embryo cryo	Re-derivation	From sperm IVF	From (frozen) Embryos#
Embryo donors	Yes	Yes	Yes	-	Yes (oocytes)	Yes	-	Yes (oocytes)	Yes
Fertile male studs	Yes	Yes	Yes	Yes	-	Yes	-	-	Yes
Infertile male studs	Yes	Yes	Yes	-	Yes	-	Yes	Yes	Yes
Foster mothers	Yes	Yes	Yes	-	Yes	-	Yes	Yes	Yes
GM mice 1st generation	Yes*	Yes*	Yes	-	Yes*	-	Yes*	Yes*	Yes*

* GM mice of the 1st generation are transferred to the project license of the client at weaning
# If sanitation is performed from frozen embryos fertile male studs and embryo donors are not required

The female donor mice, the fertile stud males, the infertile stud males and the foster mothers are at the core of all parts of the project, i.e. generation of GM mice, cryopreservation, IVF and re-derivation (sanitation). The newly generated GM mice are transferred to the project license of the client at weaning. Before weaning, at 5-7 days after birth, a toe clipping is performed to obtain a tissue sample for genotyping purposes.

The experimental procedures and related levels of discomfort for these mice are listed in Table 2. All procedures on these mice are standardized and approved standard operating procedures (SOPs) apply.

Table 2. Types of procedures and level of discomfort

	Gender	Goal	Procedures	Discomfort
Donor mouse	F	Embryo isolation	Superovulate (2 hormone injections, SOP) / Mate with fertile stud / Plug check / Sacrifice mouse / Harvest embryos, i.e. zygotes, morulae or blastocysts	Mild
		Oocyte isolation	Superovulate (2 hormone injections, SOP) / Sacrifice mouse / Harvest oocytes	Mild
Fertile male stud	M	Fertilization	Mate with female donor mouse (max. 3x per week, max 5 months active)	None
		Sperm cryopreservation	Sacrifice mouse / Harvest sperm	Mild
Infertile male stud	M	Mock fertilization	Vasectomize under anesthesia and pain relief (SOP) / Mate with foster mother (6 months active)	Moderate
Foster mother	F	Morulae/blastocyst implantation	Mate with infertile male stud / Plug check next day / Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief (SOP) or non surgical with NSET / Birth of GM pups / Wean litter / Sacrifice mouse	Mild (NSET) to Moderate (surgical)
		2-cell embryo implantation	Mate with infertile male stud / Plug check next day / Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief (SOP) / Birth of GM pups / Wean litter / Sacrifice mouse	Moderate
GM mice – genotyping	M & F	DNA extraction and analysis	Distal phalanx clipping of mouse at 5-7 days after birth (SOP) / In exceptional cases, an additional clipping of the ears is needed	Mild

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

The coherence of the activities of the AMC Transgenic Facility is graphically shown in Figure 1. The facility has three main deliverables:

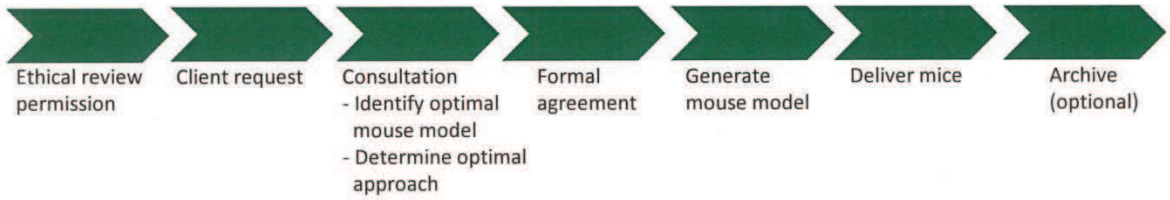
- Generation of the requested GM mouse strain for the client
- Cryopreservation and re-derivation of GM mouse strains
- Sanitation of GM mouse strains

For all deliverables prior conditions apply, which are specified below. The deliverables are generated under a full-service model, allowing for maximum control over the production process.

Conditions for services of the AMC Transgenic Facility
The AMC Transgenic Facility generates mice exclusively for AMC researchers, but not before a literature and database search (e.g. www.findmice.org) is performed to ensure the requested GM mouse is not already available. We will not start generating mice without prior ethical review permission for the requested GM strain. The client is responsible for obtaining ethical permission to perform animal experiments on the new GM strain. All generated GM mice strains are bred, genotyped and phenotyped under separate project licenses that describe the study and characterization of the new mouse strain.

The service model of the AMC Transgenic Facility
The AMC Transgenic Facility operates under a full-service model. After the client has obtained ethical permission to perform animal experiments on the new GM strain the independent steps as shown in Figure 2 are followed. In some cases, the procedures will be unsuccessful due to the biological nature of the experiments, at which point parts of procedures are repeated or an alternative strategy is devised. Once the GM mice are generated they are delivered to the client. The clients are offered to cryopreserve the early generations of the new mouse strain from F1 onwards to minimize breeding of GM mice. In principle all new GM mouse strains for AMC clients are cryopreserved.

Figure 2: Full-service model.



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	Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

3.

Format
Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028)

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Het maken en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen (diermodellen) ten behoeve van biomedisch onderzoek
1.2	Looptijd van het project	5 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Muis, genetische modificatie, biomedisch onderzoek

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- [X] Fundamenteel onderzoek
- [X] Translationeel of toegepast onderzoek
- [ ] Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- [ ] Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
- [ ] Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- [ ] Hoger onderwijs of opleiding
- [ ] Forensisch onderzoek
- [ ] Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Voor (biomedisch) onderzoek naar bijvoorbeeld de ontwikkeling van de mens en ziektebeelden bij de mens zijn diermodellen waarbij de functie van een of meerdere genen is veranderd onmisbaar. Deze genetisch gemodificeerde modellen kunnen zeer efficiënt worden gemaakt in de muis. Muismodellen van menselijke ziektebeelden kunnen essentiële informatie leveren over het ziekteverloop en behandelingsmethoden die uiteindelijk de patiënt ten goede komen. Dit project heeft als doel om voor onderzoekers zulke muismodellen te maken. Daarnaast wordt gestimuleerd om muismodellen als sperma in te vriezen, zodat het model voor de toekomst beschikbaar blijft en onnodig fokken en dus fokoverschotten worden voorkomen.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Van dit project worden diermodellen verwacht die cruciaal zijn voor de voortgang in zowel fundamenteel als toegepast onderzoek. De grote kracht van deze modellen is dat er onderzoek kan worden gedaan in het intacte dier waardoor unieke informatie beschikbaar kan komen die niet kan worden verkregen met proefdiervrije alternatieven.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	In het project zal de huismuis Mus Musculus worden gebruikt. Naar schatting zullen 16250 muizen worden gebruikt.

Deze kunnen worden onderverdeeld in embryo/eicel-donoren (11800), fertiele dekmannen (spermadonoren) (500), gesteriliseerde dekmannen (450) en draagmoeders die wel (2900) of geen (600) chirurgische ingreep ondergaan..

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

Het ene deel van de vrouwelijke muizen krijgt een hormoonbehandeling bestaande uit twee maal een injectie met een tussenpoos van 46-48 uur. Vervolgens wordt de muis bevrucht. De volgende ochtend of tot 2 dagen daarna wordt de muis gedood en worden de embryo's verzameld. Het andere deel van de vrouwelijke muizen wordt als draagmoeder voor embryo's gebruikt. Operatief worden via de flank van de muis embryo's in de eileider en/of in de baarmoeder geplaatst. Een deel van de mannelijke muizen wordt gesteriliseerd. De draagmoeders worden schijnzwanger gemaakt doordat ze door de gesteriliseerde mannen worden gedekt. Hierdoor worden ze ontvankelijk voor de embryo's. Van elk nieuw gemaakt diermodel wordt van enkele mannen het sperma ingevroren. Hiervoor wordt de muis gedood en wordt het sperma verzameld.

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

De hormoonbehandeling is licht ongerief (72,6 % van de dieren). Voor de dieren die een operatie ondergaan (gesteriliseerde mannen en draagmoeders) is het ongerief matig (20,6 % van de dieren). Bij draagmoeders die niet-chirurgisch worden behandeld is er licht ongerief (3,7 % van de dieren). De classificatie voor de spermadonoren is licht (3,1 % van de dieren).

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De gesteriliseerde mannen worden vaker gebruikt en gedood als ze oud zijn geworden en daar leed van kunnen gaan ondervinden. De draagmoeders worden na grootbrengen van de jongen gedood en niet hergebruikt om zo het ongerief voor deze dieren te beperken. De jongen worden als ze volwassen zijn in fok gezet om muizen te verkrijgen voor het onderzoek.

4 Drie V's

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

Het project is erop gericht diermodellen te maken voor de bestudering van ziekten die voorkomen bij de mens. Het effect van behandelingsmethoden kan worden gemeten alsook de werkingsmechanismen van genen, eiwitten en cellen. De beschikbaarheid van een intact genetisch gemodificeerd dier maakt in deze gevallen gericht onderzoek mogelijk. Voordat het diermodel wordt gemaakt, is er voor het onderzoek dat met de muizen gaat worden gedaan een vergunning afgegeven door de CCD. Er is dus een afweging gemaakt over het gebruik van vervangende alternatieven.

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

Alle procedures worden uitgevoerd door ervaren personeel waardoor efficiënt en met optimaal resultaat en met zo min mogelijk dieren kan worden gewerkt. Bij elk experiment wordt van elk onderdeel de efficiëntie en het slagingspercentage berekend zodat procedures waar mogelijk direct kunnen worden verbeterd. Daarnaast is er een open

		oog voor nieuwe technologieën, die leiden tot betere methoden en vermindering in het aantal benodigde dieren of het leed. Deze technologieën worden getest en, indien succesvol, ingepast in het productieproces. Bij elke nieuwe aanvraag wordt bekeken of het diermodel niet al bestaat middels het doorzoeken van literatuur en online databanken. Een reeds bestaande lijn zal niet opnieuw worden gemaakt.
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 heeft zich bewezen als soort die bij uitstek model kan staan voor bestudering van genetische factoren, eiwitten en celtypen die een rol spelen bij ziekte en ontwikkeling van de mens. Fundamenteel wetenschappelijke resultaten afkomstig uit de muis zijn in de meeste gevallen goed te vertalen naar de mens. Bovendien zijn alleen van de muis embryonale stamcellen te kweken die, afhankelijk van de vereiste methode, cruciaal zijn voor het aanbrengen van de genetische modificatie.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Operaties worden uitgevoerd onder volledige anesthesie en pijnstilling. Momenteel zijn wij bezig met het inpassen van een methode om embryo's in de baarmoeder te kunnen plaatsen zonder operatie. Hiermee wordt de welzijnsaantasting teruggebracht van matig naar licht.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Academisch Medisch Centrum (AMC), Amsterdam
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 3.4.4.1 Type of animal procedure: Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains.

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.

Two basic routes are used for the generation of GM mice:

The zygote route - This route is based on genetic engineering in fertilized oocytes (zygotes) micro-injected with DNA, RNA or protein. Zygotes are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. Following injection the zygotes are surgically implanted (under full anesthesia) in the oviduct of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The blastocyst route - This route is based on genetically engineered embryonic stem cells that are injected into blastocysts (3.5 day embryos). Blastocysts are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. The injected blastocysts are implanted (surgically under full anesthesia or non-surgically) in the uterus of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The cryopreservation program consists of two routes:

Sperm freezing, quality control and re-derivation - Male mice are sacrificed and sperm is collected, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to verify the quality of the batch by performing *In Vitro Fertilization* (IVF, see below). The number of 2-cell stage embryos is scored and projected against the total of starting oocytes. This score should be >40%. The 2-cell embryos can then be implanted in a foster mother to rederive the strain for delivery to a client or to confirm the birth of pups.

IVF – Female donor mice are superovulated and oocytes are harvested. The oocytes are counted and incubated overnight with the thawed sperm.

Embryo freezing, quality control and re-derivation - Female donor mice are superovulated and mated with male stud mice. Early pre-implantation embryos are harvested, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. The aim is to freeze 150 - 200 embryos per mouse strain. One straw is used for quality control by verifying the viability of the embryos upon thawing. Thawed and viable embryos can be implanted in a foster mother to re-derive the mouse strain or to confirm the birth of pups.

The Sanitation program:

The sanitation program consists of obtaining pre-implantation embryos that are washed thoroughly to eliminate pathogens and the subsequent implantation into foster mice. The sanitation program has two branches:

Sanitation starting from embryos – Embryos can be obtained by thawing frozen stock or freshly harvested from female donor mice. In the latter case the female donor mice are superovulated and mated with male stud mice.

Sanitation starting from frozen sperm – Sperm is thawed and IVF is performed as described above. Resulting 2-cell embryos are then transferred to the oviduct of foster mice.

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

Four different mice are required to generate new GM strains, cryopreserve and re-derive strains or sanitize strains: 1) donor mice, 2) fertile stud males, 3) infertile stud males and 4) foster mothers. And three procedures involve treatment of the mice: 1) superovulation, 2) vasectomy and 3) embryo implantation. How the proposed animal procedures relate to each different type of mouse and the level of discomfort is depicted in Table 2 of the Project Proposal. In addition:

Superovulation – Pre-puberal female mice receive 2 hormone treatments via injection 46- 48h apart. After the second treatment, the female is mated with a stud male. Next day a plug check is performed. All female mice are sacrificed 0.5-3.5 days post mating and embryos are collected. In case of oocyte isolation, the female donor mice are superovulated with the same protocol, but the timed mating is omitted. Mice are sacrificed 14-16 hours after the second hormone treatment and oocytes are collected.
Vasectomy – Vasectomy is performed on 6-8 week old male mice following our SOP "vasectomy" and takes on average 15 minutes per mouse. Mice are anesthesized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). In brief, an incision is made through the skin and the abdomen wall. The vasa deferentia are located and a small piece is removed using cautery. The 5-7 mm incision in the muscle layer is closed with sutures. Next, sutures are used to close the skin. Following surgery there is a recovery period of two weeks.
Embryo implantation – Embryos are implanted in 7 – 16 week old foster mothers (weighing 18-30 g). For surgery mice are anesthesized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). Two types of implantation are performed depending on the developmental stage of the embryos. 1) implantation in the oviduct. 2) implantation in the uterus.

1) Implantation in the oviduct is performed following our SOP "embryo implantation in the oviduct" and takes on average 15 minutes per mouse. In brief, a 5 mm incision is made through the body wall to expose the oviduct. The infundibulum is located and using a fine needle pipet the embryos are inserted. The muscle layer is closed with sutures, followed by the sutures to close the skin.
2) Embryos are implanted non-surgically in the uterus of a recipient foster mouse via a tapered catheter in the vagina using our SOP "NSET". The procedure takes 1-2 minutes and is performed without anesthesia or pain relief. Alternatively surgical implantation is performed following our SOP "embryo implantation in the uterus". Surgery is the same as described for oviduct except for the implantation step. After making the incision the beginning of the uterus is located, a puncture is made using a fine injection needle and through the puncture the embryos are inserted using a fine needle pipet.

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

Statistical methods are less applicable to these activities. Production numbers seem more applicable. We constantly monitor our achieved efficiencies and success rates, and optimize procedures where needed, thereby minimizing the number of animals.

B. The animals

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

Species – House mouse (Mus Musculus).

Origin – In house breeding or commercial breeder. In house breeding will in the future be performed for infertile male studs and foster mothers at SOPF level. This enables us to generate GM mouse strains with a SOPF health status. Maintenance of a SOPF status in the animal unit is not agreeable with regular import of animals from external sources.

Estimated numbers – The lowest number of mice required to achieve the goals of the different components of the project is known from our historical production numbers. In Table 2.1, the number of each type of experimental mouse involved in this project is specified. We foresee a demand of 50 GM strains per year, which we can generate in 120 injection sessions (Table 2.1). In general, the majority of the injection sessions will result in the birth of a GM mouse however for a proper analysis of the genetic modification several independent individuals carrying the mutation are required. Compared to our production numbers over the years 2012-2014 (see subsection 3.1 of the project proposal) there is a large increase in the demand for GM strains. This increase is based on: 1) the current work load. 2) a granted project of one of the research groups in the AMC that involves an additional 50 manipulation sessions per year for several years. 3) the rise of the CRISPR/Cas9 technology that allows one-step generation of GM strains. With the anticipated increase in the generation of GM mouse strains we also foresee an increase in our cryo-preservation activities. Upon our advice it is almost standard procedure for investigators to freeze sperm of all new GM strains. On top of that we expect to freeze embryos of 5 strains with complex genotypes. Freezing of sperm will in all cases be followed by quality control via IVF (50 sessions + 10 additional sessions in case of low fertility rate). In 10-20% of the cases the client chooses to have the embryos implanted into foster mothers and brought to term. Based on previous years we expect that 15 strains need to be re-derived from our cryo-archive per year. When a client requires a GM strain that already exists elsewhere the strain will not be generated again but will be imported into our institute via a sanitation procedure. We foresee the import of 30 GM strains per year (sperm 20 strains, embryos 10 strains).

We estimate that 16250 mice will be used: embryo/egg cell-donors (11800), fertile males (sperm-donors) (500), sterilized males (450) and foster mothers with (2900) or without (600) surgical procedures.

Table 2.1. Types and numbers of experimental mice required

	Generation of GM mice		**Process optimization** *	**Cryopreservation and re-derivation**				**Sanitation**	
	Zygote route	Blastocyst route		Sperm cryo	IVF (QC)	Embryo cryo	Re-derivation $^{\Omega}$	From sperm IVF	From (frozen) embryos $^{\Sigma}$
Sessions/year Strains/year	90	30		50	60	5	15	20	10
Embryo donors	$90*15^{\$}=$ **1350**	$30*15^{\$}=$ **450**	n.a.	-	$60*2^{\$}=$ **120** (oocytes)	$5*40^{\$}=$ **200**	$10*6^{\$}=$ **60** (oocytes)	$20*6^{\$}=$ **120** (oocytes)	$10*6^{\$}=$ **60**
Fertile male studs	-	-	-	$50*2^{\$}=$ **100**	-	-	-	-	-
Infertile male studs	$\mathbf{90}^{\$\#}$==→	===→===	===→===	-	==→==	-	===→===	====→=====	===→===
Foster mothers	$90*4^{\$}=$ **360**	$30*4^{\$}=$ **120**	n.a.	-	$10*4^{\$}=$ **40**	-	$15*4^{\$}=$ **60**	$20*4^{\$}=$ **80**	$10*4^{\$}=$ **40**
Total/1 year Total/5 year	**1800** **9000**	**570** **2850**		**100** **500**	**160** **800**	**200** **1000**	**120** **600**	**200** **1000**	**100** **500**

* Optimization attemps (such as subtle changes in media, concentrations and incubation times) are performed during regular sessions of Generation, Cryopreservation and Sanitation and do not require

additional animals. (Approximately 5-10% of the cases)..
$ Numbers of mice required are based on the average of our 2012-2014 production numbers.
# The same infertile male studs are used in different branches of the project (90/year total).
∑ If sanitation is performed from frozen embryos, embryo donors are not required.
Ω It is anticipated that re-derivation will be performed 10 times from frozen sperm and 5 times from frozen embryos.
n.a. not applicable, these mice are accounted for in the other columns.
QC, Quality Control

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X 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.

The 3R's in animal testing are an important theme in the AMC Transgenic Facility. They are implemented as follows:

Reduction – 1) Upon request for the generation of a new mouse strain a search is performed in online databases to check whether that strain already exists. An already existing strain will not be generated again but will be imported into the facility. **2)** New GM strains will be created directly on the desired strain background. The latest technological advances, such as Crispr/Cas9 gene editing, make this feasible. This prevents backcrossing to another strain background, typically for 10 generations, leading to a considerable reduction in mice. **3)** AMC Transgenic Facility aims to optimize and standardize procedures to be able to more efficiently generate GM mice, thereby reducing repeat injections due to lack of success. An example of an optimization is using the best suited mouse strain for embryo donation. The yield of high-quality embryos varies between mouse strains and identifying the optimal strain can reduce the number of embryo donor mice required. An example of standardization is the age and weight of the donor and stud mice. To maximize fertility we exclusively select female donor mice of 3-8 weeks old and male studs of 2 months, which are repeatedly used to a maximum of 5 months. **4)** After generation of a GM mouse strain we strongly encourage the investigator to cryopreserve the strain at an early generation. Cryopreservation ensures the availability of the strain in the future and eliminates breeding.
Refinement – In the production process, the non-surgical embryo transfer (NSET) method is starting to replace the surgical implantation method for ESC-injected blastocysts. This reduces the discomfort level in foster mothers from moderate to mild. This technique is in the process of being implemented. In most cases NSET will be used, but for validation purposes we will occasionally choose surgical implantation.
Replacement - A client that requests a new mouse model is made aware of alternative methods to answer their scientific question that do not require experimental animals, for instance using in vitro organoid models.

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

All surgical procedures are performed under full anesthesia and pain relief is applied. When applicable, embryo implantations are performed with the non-surgical embryo transfer (uterus, NSET) with minimal discomfort to the foster mother. Unfortunately, the NSET method is not effective for injected zygotes.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X 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?

X No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Within the AMC, we have standard operation protocols for each (surgical) procedure. Together with the animal welfare officer of the AMC we developed protocols for the most appropriate / suitable methods for anaesthesia and analgesia. These may be subjected to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse effects on the animals' welfare other than those already mentioned are not expected.

Explain why these effects may emerge.

In Table 2 of the project proposal, the level of discomfort is provided for each procedure. All are mild, except for the surgical procedures, i.e. vasectomy and surgical implantation of embryos, that are considered to be moderate. Besides the fertile male stud mice used for sperm cryopreservation undergoing terminal discomfort, all other fertile male studs have no discomfort and are not registered as experimental animals in this project proposal.

Procedures with mild discomfort:
Timed mating - Female mice are handled to verify a vaginal plug the morning after the mating (plug check). This procedure applies to 100% of the embryo donors and 100% of the foster mothers.
Superovulation - Female mice receive two hormone treatments via injection 46-48h apart. This procedure applies to 100% of the embryo (and oocyte) donors.
Non-surgical embryo implantation – Embryos are implanted in a time-mated foster mother using a tapered catheter in the vagina. The procedure applies in principle to all the foster mothers in the blastocyst route. See "Surgical embryo implantation" below.

Surgical procedures with moderate discomfort:
Vasectomy - Vasectomize under anesthesia and pain relief. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime. This procedure applies to 100% of the infertile stud males.
Surgical embryo implantation - Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief. Foster mothers in the blastocyst route are scheduled to receive embryos non-surgically via the vagina into the uterus using the NSET. In few cases blastocysts will be implanted surgically for validation purposes of the NSET technique. This will occur when there are no or unusually small litters born to discriminate between embryonic lethality due to the introduced mutation or the use of NSET which is in the process of being implemented. All other foster mothers in the project receive embryos from an earlier developmental stage via surgical implantation. These embryos must be placed in the oviduct which is not accessible through the vagina. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime.

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.

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

Two surgical procedures are performed, i.e. vasectomy and surgical embryo implantation. When a complication arises during or after surgery, the mouse will be euthanized. Apart from possible experimental complications a SOP "Clinical symptoms" is in place that applies to all mice and describes the criteria to identify humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

< 3%

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').

Embryo donors (10300): mild
Oocyte donors (1500): mild
Fertile male studs, sperm donors (500): mild
Infertile male studs (450): moderate
Foster mothers, surgical (600): moderate
Foster mothers, non-surgical (2900): mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

1. Embryo donors – mice are killed to collect the embryos.
2. Fertile stud males – two male mice of each new GM strain are killed to collect sperm.
3. Infertile stud males – male mice are repeatedly used, up to 4-6 months. Maximum age of infertile stud mice is between 8-9 months. Their libido diminishes after this age and therefore the aged mice are not suitable anymore.
4. Foster mothers – mice are killed after weaning of the pups.

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

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

X Yes

5.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project — Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains

3. Titel van de NTS — Het maken en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen (diermodellen) ten behoeve van biomedisch onderzoek

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC — DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon — [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken — 4 mei 2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn

opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager nvt
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager nvt
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen.
   - Datum antwoord
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - De antwoorden hebben wel~~/niet~~ geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
   >ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/ een wijziging op een bestaande vergunning~~.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
   >ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
   >Nee, er waren geen DEC leden uitgesloten.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het beschikbaar stellen van speciaal gemaakte genetisch gemodificeerde muislijnen voor onderzoekers van het AMC, de mogelijkheid te bieden om deze lijnen te bewaren door sperma in te vriezen in vloeibare

stikstof voor later gebruik, het opschonen van al bestaande genetisch gemodificeerde muizen via embryo transplantatie). De verschillende doelen dragen allen bij aan de voorziening voor onderzoekers om genetisch gemodificeerde diermodellen te kunnen gebruiken.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
   >nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën "basic research" en "translational or applied research" sluiten aan bij het uiteindelijke doel waarvoor de muizen gemaakt/bewaard/opgeschoond worden. Deze projectaanvraag lijkt beter te passen onder "regulatory use or routine production", aangezien dit project toestemming vraagt om muizen te maken, te bewaren of op te schonen, maar die binnen dit project nog niet gebruikt zullen worden voor biomedisch fundamenteel of toegepast onderzoek', al zal dit wel het uiteindelijke doel zijn.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.
   Het directe doel (het maken/bewaren/opschonen van genetisch gemodificeerde muizen met inachtneming van nieuwe ontwikkelingen) zal bijdragen aan het uiteindelijke doel: het beschikbaar stellen van speciaal gemaakte genetisch gemodificeerde muizen voor biomedisch onderzoek door het AMC. Het directe doel is gerechtvaardigd binnen de context van het uiteindelijke doel. Dit wordt geborgd doordat de betreffende muislijn enkel vervaardigd/bewaard/opgeschoond zal worden voor reeds ethisch getoetst en goedgekeurd biomedisch onderzoek.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het vervaardigen/bewaren/opschonen van genetisch gemodificeerde muizen zijn de proefdieren, de medewerkers van de faciliteit en uiteindelijk de onderzoekers van het AMC die gebruik maken van diermodellen met genetisch gemodificeerde muizen. Deze faciliteit creëert een toegang tot dit soort modellen voor AMC onderzoekers, door hun specifieke expertise en voorzieningen. De toegang tot deze modellen kan bijdragen aan hoogwaardig kwalitatief onderzoek wat uiteindelijk kan leiden tot grote maatschappelijke belangen en in mindere mate het AMC die profiteert van de status van een goed presterend onderzoeksinstituut.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

   Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

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

   De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij het vervaardigen/bewaren/opschonen van GM muislijnen voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.
   De kwaliteit en kundigheid van de medewerkers zijn geborgd door meerdere jaren aan ervaring met deze technieken en de reeds bestaande faciliteit. De DEC acht de kwaliteit door de opzet van deze genetische muislijnen voldoende gewaarborgd.

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

   Het voorstel geeft een duidelijke omschrijving van de verschillende doelen die allen bijdragen aan het bieden van een toegang aan onderzoekers naar diermodellen op basis van genetisch gemodificeerde muislijnen. De verschillende doelen worden duidelijk omschreven in de aanvraag. De verschillende routes waarop genetisch gemodificeerde muizen gemaakt worden (zygote route of blastocyst route), het bewaren van muizenlijnen d.m.v. sperma/eicellen/embryo's in vloeibaar stikstof in te vriezen en het opschonen van dieren (uitgaande van embryo's of sperma). Daarnaast worden voorbeelden gegeven van de "nieuwe" ontwikkelingen zoals een transplantatie methode via de vagina zonder de noodzaak van een operatie en de opkomst van CRISPR/cas9. De DEC is van mening dat de beschreven aanpak logisch aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling.

Welzijn dieren

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

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

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

    Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*.

    De ongeriefinschatting is stand gekomen met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief en op advies van de IvD. Het ongerief is per handeling realistisch ingeschat . De DEC meent dat de inschattingen van ongerief juist zijn.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).*

    Bij het vervaardigen van genetisch gemanipuleerde muislijnen wordt de integriteit aangetast omdat het genoom gemodificeerd wordt. Er wordt niet verwacht dat deze ingreep de "heelheid" van het dier zodanig aantast dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Het herstellen van een operatie (vasectomie en operatieve plaatsing van een embryo) kan pijn en stress veroorzaken waardoor hun natuurlijke gedrag beïnvloed kan worden. Dit wordt (getracht te) voorkomen door het toepassen van pijnstilling.

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

    Het humane eindpunt is als volgt gedefinieerd: indien er complicaties optreden tijdens of na het verrichten van een operatie,
    De DEC is van mening dat dieren hierdoor goed beschermd worden tegen onvoorzien ongerief.

    3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
    De doelstelling van dit project is niet verenigbaar met een geschikt proefdiervrij alternatief. Buiten dit project is het gebruik van de genetisch gemodificeerde muislijnen al eerder getoetst of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn voor het betreffende muismodel.

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

    De berekening van het aantal dieren is navolgbaar. Het aantal dieren dat nodig is om een succesvol een genetisch gemodificeerde muis te maken/te bewaren/op te

schonen is op ervaring berekend. Er wordt voorzien dat er een stijging in het aantal opdrachten zal komen, vergeleken met het verleden. Er worden drie redenen gegeven: de huidige werkdruk, de goedkeuring van een AMC project waarin voorzien wordt dat er 50 manipulatie sessies/jaar zullen plaatsvinden voor meerdere jaren, de opkomst van de CRISPR/cas9 technologie waardoor het minder tijdrovend is om een genetische manipulatie uit te voeren. De DEC schat deze verwachte stijging naar 50 GM lijnen (waar 120 injectie sessies voor nodig zouden zijn) realistisch in. De DEC vindt de inschatting dat het aantal lijnen die ingevroren zullen worden hierdoor ook mee zullen stijgen, logisch.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
    De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:
    1) de operatieve embryo terugplaatsing in de baarmoeder wordt vervangen door een niet-operatieve plaatsing via de vagina (nu nog in de implementatie fase);
    2) de operaties (vasectomie en operatieve terugplaatsing embryo) worden uitgevoerd onder algehele verdoving en met geschikte post-operatieve pijnbestrijding;
    3) de medewerkers allemaal zeer ervaren zijn in de betreffende technieken en daardoor onnodig ongerief voorkomen wordt bij de proefdieren.

    De humane eindpunten zijn daarnaast duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

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

    Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).*
    Deze voorwaarde is niet van toepassing op dit project, aangezien het verzamelen van eicellen, embryo's en sperma sekse gebonden is.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).*

    Ja, voor de verschillende handelingen wordt aangegeven waarom de muizen worden gedood. De muizen worden gedood om embryo's, eicellen of sperma te verzamelen. De draagmoeders worden na het verspenen gedood. De onvruchtbare mannetjes muizen worden herhaaldelijk ingezet totdat ze 8-9 maanden worden. Op deze leeftijd zakt het libido en zijn ze niet meer geschikt om een schijnzwangerschap te

veroorzaken bij de draagmoeders. De dieren zullen volgens de richtlijn gedood worden.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
nvt

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid. De NTS is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).*
Rechtvaardigt het verkrijgen, bewaren en opschonen van genetisch gemodificeerde muislijnen, het lichte tot matige ongerief dat de muizen tijdens deze handelingen zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat tot doel heeft om onderzoekers van het AMC te voorzien in genetisch gemodificeerde muislijnen voor biomedisch onderzoek, zijn de proefdieren en de medewerkers van de faciliteit, en in mindere mate de onderzoekers van het AMC die genetisch gemodificeerde muizen gebruiken voor hun onderzoek en het AMC zelf.

De muizen worden in dit project geschaad omdat ze stress en mogelijk pijn zullen ondervinden. Het getimede paren, de superovulatie (hormoonbehandelingen), het plaatsen van een embryo via de vagina kan stress veroorzaken bij de muizen en de operaties (vasectomie of transplanteren van een embryo of eicel in baarmoeder/eileiders) kan eventueel pijn en stress veroorzaken. In het grootste gedeelte van de dieren zal het ongerief geclassificeerd kunnen worden als licht. In een klein gedeelte (20%) van de dieren zal het ongerief maximaal matig kunnen worden doordat de dieren bijkomen uit de narcose en moeten herstellen van een operatie. Indien nodig zal er pijnstilling gegeven worden na de operatie.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de medewerkers van de faciliteit hebben een financieel belang bij deze vergunning doordat de faciliteit arbeidsgelegenheid biedt. De onderzoekers van het AMC wordt de mogelijkheid geboden om biomedisch onderzoek te doen met genetisch gemanipuleerde muislijnen wat bijdraagt aan de kwaliteit van hun onderzoek. Het AMC heeft er belang bij dat hun onderzoekers toegang hebben tot

onderzoek waarin genetisch gemanipuleerde muislijnen gebruikt worden. De geboden faciliteiten door een instituut kunnen bijdragen aan de keus van (goede) onderzoekers om bij die instelling te gaan werken, daarnaast heeft het AMC belang bij het publiceren in toptijdschriften door hun onderzoekers, waar deze faciliteit aan bij kan dragen.

Maximaal 16250 muizen zullen gering tot matig ongerief ondergaan. De DEC acht dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van het verkrijgen van genetisch gemanipuleerde muislijnen, maar ook het bewaren en opschonen met inachtneming van nieuwe ontwikkelingen, omdat het hier enkel lijnen betreft waarvan de toepassing in biomedisch onderzoek al getoetst is op haalbaarheid en opbrengst ten opzichte van het geschatte ongerief. De DEC weegt het uiteindelijke wetenschappelijke en maatschappelijke belang, dat buiten dit project ligt, mee in het afwegen van de belangen.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Het maken en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen (diermodellen) ten behoeve van biomedisch onderzoek

De DEC is van mening dat het belang van het maken van en beschikbaar stellen van genetisch gemanipuleerde muislijnen (alsmede het bewaren van deze lijnen en het opschonen ervan) voor reeds goedgekeurd biomedisch onderzoek, het geringe (80%) tot matige (20%) ongerief dat de muizen zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In deze vergunning worden voornamelijk genetisch gemanipuleerde muizen op verzoek van onderzoekers gemaakt voor reeds ethisch goedgekeurd biomedisch onderzoek, vervolgens wordt de mogelijkheid geboden om de muislijn te bewaren door middel van cryo preservatie of indien de lijn al elders is gecreëerd te worden opgeschoond tot een gespecificeerde pathogeen vrije status, dit alles met inachtneming van nieuwe ontwikkelingen. Het feit dat de muislijnen alleen geproduceerd worden voor reeds goedgekeurd onderzoek borgt indirect het maatschappelijk of wetenschappelijk belang van het genereren van deze muislijnen. De faciliteit draait al meerdere jaren en de medewerkers hebben ruime ervaring in de beschreven handelingen, er is daarnaast genoeg kennis en kunde in huis om de 3V's te kunnen toepassen. De meeste dieren zullen gering ongerief ondergaan door de voorgestelde handelingen, welke uitgevoerd zullen worden door ervaren medewerkers. Het matige ongerief zal veroorzaakt worden doordat dieren geopereerd worden en daarvan moeten herstellen. In het geval van embryo transplantatie wordt de methode verfijnd doordat er momenteel een niet-operatieve methode via de vagina geïmplementeerd wordt. De DEC erkent dat het verkrijgen van genetisch gemodificeerde muizen noodzakelijk kan zijn om bepaalde vraagstellingen te beantwoorden en dat het genereren van deze muislijnen daarom gerechtvaardigd is ten opzichte van het ongerief dat de muizen in dit "productie proces" ondergaan.
De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde opzet van dit project waarin ook muislijnen ingevroren worden zodat een nieuwe ronde van de genetische manipulatie voorkomen kan worden, alsmede het opschonen van reeds bestaande lijnen bijdraagt

aan een vermindering van het aantal proefdieren dat gebruikt wordt tijdens het genereren. De gekozen aanpak van het project kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende toegang heeft tot kennis en kunde met betrekking tot de voorgestelde handelingen om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken doordat er veel ervaring is met het aantal dieren dat nodig is voor iedere methode. Dit projectvoorstel is inherent aan proefdiergebruik, er kunnen immers geen proefdieren verkregen worden met een proefdiervrij alternatief.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
      ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
      ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
      ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Er zijn geen knelpunten of dilemma’s naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef [redacted]
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171287

Bijlagen
2

Datum 11 juli 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 juli 2017. Het gaat om uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020171287. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
11 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
11 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11800
Naam instelling of organisatie:	Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	[redacted]
Straat en huisnummer:	Meibergdreef 31
Postcode en plaats:	1105 AZ AMSTERDAM
IBAN:	NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	Principal Investigator/ Onderzoeker
Afdeling:	Genetically Engineered Mouse Models
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Datum:
11 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2018
Geplande einddatum:	31 december 2022
Titel project:	Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains
Titel niet-technische samenvatting:	Het genereren, saneren en invriezen van genetisch gemodificeerde muizenlijnen ten behoeve van biomedisch onderzoek
Naam DEC:	DEC AMC
Postadres DEC:	Meibergdreef 31, 1105 AZ Amsterdam
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 35,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	10 juli 2017

Centrale Commissie Dierproeven

7.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef [redacted]
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171287

Datum 14 juli 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 10 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" met aanvraagnummer AVD1180020171287. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

Onduidelijkheden
In de NTS staat dat 2900 draagmoeders wel en 600 geen chirurgische ingreep zullen ondergaan en dat in totaal 79,4% licht en 20,6% matig ongerief zal ondergaan. Uit de Bijlage Dierproeven blijkt uit de tabel onder K dat 600 draagmoeders wel en 2900 geen chirurgische ingreep zullen ondergaan, waarmee het ongerief ook anders uitkomt. Overigens komen de gegevens van de Bijlage Dierproeven onder B overeen met de NTS. Kunt u aangeven welke van deze cijfers juist zijn en een nieuw document (NTS of Bijlage Dierproeven) sturen met de juiste gegevens?

Kunt u daarnaast een nieuwe NTS sturen, waarin u onder 3.3 'huismuis' wijzigt in bijvoorbeeld 'muis'. Dit omdat 'huismuis' bij de doelgroep van de NTS niet overeenkomt met het beeld van de laboratoriummuizen.

Datum:
14 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

Leges
De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

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

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven

Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD1180020171287

2 Bijlagen
Welke bijlagen stuurt u mee?
Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

O Projectvoorstel

O Beschrijving Dierproeven

O Niet-technische samenvatting

O Melding Machtiging

O Aanvraagformulier

O .....

O .....

O .....

Datum:
14 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

3 Ondertekening

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Academisch Medisch Centrum (AMC), Amsterdam

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

Serial number	Type of animal procedure
3.4.4.1	Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains.

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.

Two basic routes are used for the generation of GM mice:

The zygote route - This route is based on genetic engineering in fertilized oocytes (zygotes) micro-injected with DNA, RNA or protein. Zygotes are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. Following injection the zygotes are surgically implanted (under full anesthesia) in the oviduct of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The blastocyst route - This route is based on genetically engineered embryonic stem cells that are injected into blastocysts (3.5 day embryos). Blastocysts are harvested from a superovulated female donor mouse that has mated with a fertile stud male. The injected blastocysts are implanted (surgically under full anesthesia or non-surgically) in the uterus of a pseudopregnant foster mother that was time-mated with a sterile stud male. The foster mother brings the embryos to term, and suckles and weans the pups.

The cryopreservation program consists of two routes:

Sperm freezing, quality control and re-derivation - Male mice are sacrificed and sperm is collected, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. One straw is used to verify the quality of the batch by performing *In Vitro Fertilization* (IVF, see below). The number of 2-cell stage embryos is scored and projected against the total of starting oocytes. This score should be >40%. The 2-cell embryos can then be implanted in a foster mother to rederive the strain for delivery to a client or to confirm the birth of pups.

IVF – Female donor mice are superovulated and oocytes are harvested. The oocytes are counted and incubated overnight with the thawed sperm.

Embryo freezing, quality control and re-derivation - Female donor mice are superovulated and mated with male stud mice. Early pre-implantation embryos are harvested, frozen in straws and stored in liquid nitrogen. The aim is to freeze 150 - 200 embryos per mouse strain. One straw is used for quality control by verifying the viability of the embryos upon thawing. Thawed and viable embryos can be implanted in a foster mother to re-derive the mouse strain or to confirm the birth of pups.

The Sanitation program:

The sanitation program consists of obtaining pre-implantation embryos that are washed thoroughly to eliminate pathogens and the subsequent implantation into foster mice. The sanitation program has two branches:

Sanitation starting from embryos – Embryos can be obtained by thawing frozen stock or freshly harvested from female donor mice. In the latter case the female donor mice are superovulated and mated with male stud mice.

Sanitation starting from frozen sperm – Sperm is thawed and IVF is performed as described above. Resulting 2-cell embryos are then transferred to the oviduct of foster mice.

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

Four different mice are required to generate new GM strains, cryopreserve and re-derive strains or sanitize strains: 1) donor mice, 2) fertile stud males, 3) infertile stud males and 4) foster mothers. And three procedures involve treatment of the mice: 1) superovulation, 2) vasectomy and 3) embryo implantation. How the proposed animal procedures relate to each different type of mouse and the level of discomfort is depicted in Table 2 of the Project Proposal. In addition:

Superovulation – Pre-puberal female mice receive 2 hormone treatments via injection 46- 48h apart. After the second treatment, the female is mated with a stud male. Next day a plug check is performed. All female mice are sacrificed 0.5-3.5 days post mating and embryos are collected. In case of oocyte isolation, the female donor mice are superovulated with the same protocol, but the timed mating is omitted. Mice are sacrificed 14-16 hours after the second hormone treatment and oocytes are collected.
Vasectomy – Vasectomy is performed on 6-8 week old male mice following our SOP "vasectomy" and takes on average 15 minutes per mouse. Mice are anesthesized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). In brief, an incision is made through the skin and the abdomen wall. The vasa deferentia are located and a small piece is removed using cautery. The 5-7 mm incision in the muscle layer is closed with sutures. Next, sutures are used to close the skin. Following surgery there is a recovery period of two weeks.
Embryo implantation – Embryos are implanted in 7 – 16 week old foster mothers (weighing 18-30 g). For surgery mice are anesthesized and pain relief is administered (detailed and approved SOPs apply). Two types of implantation are performed depending on the developmental stage of the embryos. 1) implantation in the oviduct. 2) implantation in the uterus.

1) Implantation in the oviduct is performed following our SOP "embryo implantation in the oviduct" and takes on average 15 minutes per mouse. In brief, a 5 mm incision is made through the body wall to expose the oviduct. The infundibulum is located and using a fine needle pipet the embryos are inserted. The muscle layer is closed with sutures, followed by the sutures to close the skin.
2) Embryos are implanted non-surgically in the uterus of a recipient foster mouse via a tapered catheter in the vagina using our SOP "NSET". The procedure takes 1-2 minutes and is performed without anesthesia or pain relief. Alternatively surgical implantation is performed following our SOP "embryo implantation in the uterus". Surgery is the same as described for oviduct except for the implantation step. After making the incision the beginning of the uterus is located, a puncture is made using a fine injection needle and through the puncture the embryos are inserted using a fine needle pipet.

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

Statistical methods are less applicable to these activities. Production numbers seem more applicable. We constantly monitor our achieved efficiencies and success rates, and optimize procedures where needed, thereby minimizing the number of animals.

B. The animals

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

Species – House mouse (Mus Musculus).

Origin – In house breeding or commercial breeder. In house breeding will in the future be performed for infertile male studs and foster mothers at SOPF level. This enables us to generate GM mouse strains with a SOPF health status. Maintenance of a SOPF status in the animal unit is not agreeable with regular import of animals from external sources.

Estimated numbers – The lowest number of mice required to achieve the goals of the different components of the project is known from our historical production numbers. In Table 2.1, the number of each type of experimental mouse involved in this project is specified. We foresee a demand of 50 GM strains per year, which we can generate in 120 injection sessions (Table 2.1). In general, the majority of the injection sessions will result in the birth of a GM mouse however for a proper analysis of the genetic modification several independent individuals carrying the mutation are required. Compared to our production numbers over the years 2012-2014 (see subsection 3.1 of the project proposal) there is a large increase in the demand for GM strains. This increase is based on: 1) the current work load. 2) a granted project of one of the research groups in the AMC that involves an additional 50 manipulation sessions per year for several years. 3) the rise of the CRISPR/Cas9 technology that allows one-step generation of GM strains. With the anticipated increase in the generation of GM mouse strains we also foresee an increase in our cryo-preservation activities. Upon our advice it is almost standard procedure for investigators to freeze sperm of all new GM strains. On top of that we expect to freeze embryos of 5 strains with complex genotypes. Freezing of sperm will in all cases be followed by quality control via IVF (50 sessions + 10 additional sessions in case of low fertility rate). In 10-20% of the cases the client chooses to have the embryos implanted into foster mothers and brought to term. Based on previous years we expect that 15 strains need to be re-derived from our cryo-archive per year. When a client requires a GM strain that already exists elsewhere the strain will not be generated again but will be imported into our institute via a sanitation procedure. We foresee the import of 30 GM strains per year (sperm 20 strains, embryos 10 strains).

We estimate that 16250 mice will be used: embryo/egg cell-donors (11800), fertile males (sperm-donors) (500), sterilized males (450) and foster mothers with (2900) or without (600) surgical procedures.

Table 2.1. Types and numbers of experimental mice required

	Generation of GM mice		**Process optimization** *	**Cryopreservation and re-derivation**				**Sanitation**	
	Zygote route	Blastocyst route		Sperm cryo	IVF (QC)	Embryo cryo	Re-derivation $^{\Omega}$	From sperm IVF	From (frozen) embryos $^{\Sigma}$
Sessions/year Strains/year	90	30		50	60	5	15	20	10
Embryo donors	$90*15^{\$}=$ **1350**	$30*15^{\$}=$ **450**	n.a.	-	$60*2^{\$}=$ **120** (oocytes)	$5*40^{\$}=$ **200**	$10*6^{\$}=$ **60** (oocytes)	$20*6^{\$}=$ **120** (oocytes)	$10*6^{\$}=$ **60**
Fertile male studs	-	-	-	$50*2^{\$}=$ **100**	-	-	-	-	-
Infertile male studs	$\mathbf{90}^{\$\#}$==→	===→===	===→===	-	==→==	-	===→===	====→=====	===→===
Foster mothers	$90*4^{\$}=$ **360**	$30*4^{\$}=$ **120**	n.a.	-	$10*4^{\$}=$ **40**	-	$15*4^{\$}=$ **60**	$20*4^{\$}=$ **80**	$10*4^{\$}=$ **40**
Total/1 year Total/5 year	**1800** **9000**	**570** **2850**		**100** **500**	**160** **800**	**200** **1000**	**120** **600**	**200** **1000**	**100** **500**

* Optimization attemps (such as subtle changes in media, concentrations and incubation times) are performed during regular sessions of Generation, Cryopreservation and Sanitation and do not require

additional animals. (Approximately 5-10% of the cases)..
$ Numbers of mice required are based on the average of our 2012-2014 production numbers.
# The same infertile male studs are used in different branches of the project (90/year total).
∑ If sanitation is performed from frozen embryos, embryo donors are not required.
Ω It is anticipated that re-derivation will be performed 10 times from frozen sperm and 5 times from frozen embryos.
n.a. not applicable, these mice are accounted for in the other columns.
QC, Quality Control

C. Re-use

Will the animals be re-used?

X 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.

The 3R's in animal testing are an important theme in the AMC Transgenic Facility. They are implemented as follows:

Reduction – 1) Upon request for the generation of a new mouse strain a search is performed in online databases to check whether that strain already exists. An already existing strain will not be generated again but will be imported into the facility. **2)** New GM strains will be created directly on the desired strain background. The latest technological advances, such as Crispr/Cas9 gene editing, make this feasible. This prevents backcrossing to another strain background, typically for 10 generations, leading to a considerable reduction in mice. **3)** AMC Transgenic Facility aims to optimize and standardize procedures to be able to more efficiently generate GM mice, thereby reducing repeat injections due to lack of success. An example of an optimization is using the best suited mouse strain for embryo donation. The yield of high-quality embryos varies between mouse strains and identifying the optimal strain can reduce the number of embryo donor mice required. An example of standardization is the age and weight of the donor and stud mice. To maximize fertility we exclusively select female donor mice of 3-8 weeks old and male studs of 2 months, which are repeatedly used to a maximum of 5 months. **4)** After generation of a GM mouse strain we strongly encourage the investigator to cryopreserve the strain at an early generation. Cryopreservation ensures the availability of the strain in the future and eliminates breeding.
Refinement – In the production process, the non-surgical embryo transfer (NSET) method is starting to replace the surgical implantation method for ESC-injected blastocysts. This reduces the discomfort level in foster mothers from moderate to mild. This technique is in the process of being implemented. In most cases NSET will be used, but for validation purposes we will occasionally choose surgical implantation.
Replacement - A client that requests a new mouse model is made aware of alternative methods to answer their scientific question that do not require experimental animals, for instance using in vitro organoid models.

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

All surgical procedures are performed under full anesthesia and pain relief is applied. When applicable, embryo implantations are performed with the non-surgical embryo transfer (uterus, NSET) with minimal discomfort to the foster mother. Unfortunately, the NSET method is not effective for injected zygotes.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

X 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?

X No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Within the AMC, we have standard operation protocols for each (surgical) procedure. Together with the animal welfare officer of the AMC we developed protocols for the most appropriate / suitable methods for anaesthesia and analgesia. These may be subjected to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse effects on the animals' welfare other than those already mentioned are not expected.

Explain why these effects may emerge.

In Table 2 of the project proposal, the level of discomfort is provided for each procedure. All are mild, except for the surgical procedures, i.e. vasectomy and surgical implantation of embryos, that are considered to be moderate. Besides the fertile male stud mice used for sperm cryopreservation undergoing terminal discomfort, all other fertile male studs have no discomfort and are not registered as experimental animals in this project proposal.

Procedures with mild discomfort:
Timed mating - Female mice are handled to verify a vaginal plug the morning after the mating (plug check). This procedure applies to 100% of the embryo donors and 100% of the foster mothers.
Superovulation - Female mice receive two hormone treatments via injection 46-48h apart. This procedure applies to 100% of the embryo (and oocyte) donors.
Non-surgical embryo implantation – Embryos are implanted in a time-mated foster mother using a tapered catheter in the vagina. The procedure applies in principle to all the foster mothers in the blastocyst route. See "Surgical embryo implantation" below.

Surgical procedures with moderate discomfort:
Vasectomy - Vasectomize under anesthesia and pain relief. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime. This procedure applies to 100% of the infertile stud males.
Surgical embryo implantation - Surgical embryo implantation under anesthesia and pain relief. Foster mothers in the blastocyst route are scheduled to receive embryos non-surgically via the vagina into the uterus using the NSET. In few cases blastocysts will be implanted surgically for validation purposes of the NSET technique. This will occur when there are no or unusually small litters born to discriminate between embryonic lethality due to the introduced mutation or the use of NSET which is in the process of being implemented. All other foster mothers in the project receive embryos from an earlier developmental stage via surgical implantation. These embryos must be placed in the oviduct which is not accessible through the vagina. A SOP is in place for both the procedure and the pain relief regime.

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.

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

Two surgical procedures are performed, i.e. vasectomy and surgical embryo implantation. When a complication arises during or after surgery, the mouse will be euthanized. Apart from possible experimental complications a SOP "Clinical symptoms" is in place that applies to all mice and describes the criteria to identify humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

< 3%

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').

Embryo donors (10300): mild
Oocyte donors (1500): mild
Fertile male studs, sperm donors (500): mild
Infertile male studs (450): moderate
Foster mothers, surgical (2900): moderate
Foster mothers, non-surgical (600): mild

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

1. Embryo donors – mice are killed to collect the embryos.
2. Fertile stud males – two male mice of each new GM strain are killed to collect sperm.
3. Infertile stud males – male mice are repeatedly used, up to 4-6 months. Maximum age of infertile stud mice is between 8-9 months. Their libido diminishes after this age and therefore the aged mice are not suitable anymore.
4. Foster mothers – mice are killed after weaning of the pups.

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

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

X Yes

9.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef[redacted]
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171287
Bijlagen
1

Datum 12 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 10 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" met aanvraagnummer AVD1180020171287. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 17 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS en verduidelijking van het aantal dieren dat een chirurgische ingreep zal ondergaan.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

De voorwaarde betreffende de rapportage geldt omdat de CCD hiermee vorm geeft aan de maatregelen die volgen uit het advies van het NCad; 'genetisch gemodificeerde dieren in voorraad gedood' en de oproep van de Staatssecretaris die volgt uit de voortgangsrapportage van 1 november 2015.

U kunt met uw project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
12 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 juli 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

ir. G. de Pooter
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains" met aanvraagnummer AVD1180020171287, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/ Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 juli 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 juli 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 juli 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 juli 2017, ontvangen op 10 juli 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 17 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Generation, cryopreservation, re-derivation and sanitation of genetically modified mouse strains				
	Muizen (Mus musculus) /	16.250	21% Matig 79% Licht	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Elk jaar, voor 1 april, wordt op basis van de getallen benodigd voor de registratie voor de NVWA een rapportage gedaan betreffende de fok; het aanhouden van lijnen met ongerief. U beschrijft hierbij welke aantallen dieren in de fok zijn ingezet, voor het aantal dieren dat is gefokt beschrijft u hoeveel dieren in de experimenten zijn ingezet, hoeveel dieren in voorraad zijn gedood wegens ongeschikt genotype of in voorraad zijn gedood wegens overtollig. U licht hierbij ook toe welke maatregelen u neemt om het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen.

Aanvraagnummer:
AVD1180020171287

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.

1.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11800
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	343362777	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31
Postbus		
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam
IBAN	[redacted]	

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.

Tenaamstelling van het rekeningnummer	AMC crediteurenadministratie Postbus 400 1115 ZJ Duivendrecht Kostenplaatsnummer: [redacted]

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]
Functie	Universitair Docent (UD)
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]
Functie	Onderzoeker in opleiding (OIO)
Afdeling	[redacted]
Telefoonnummer	[redacted]
E-mailadres	[redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 9 - 2017
		Einddatum	1 - 9 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Kwantificatie van de ontstekingrespons na een hartinfarct met 19F MRI	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het meten van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met MRI	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC AMC
		Postadres	Meibergdreef 31 1105 AZ Amsterdam
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	
Plaats	Amsterdam
Datum	2 - 8 - 2017
Handtekening	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
1.3	Vul de titel van het project in.	Kwantificatie van ontsteking na een hartinfarct met ^{19}F MRI

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

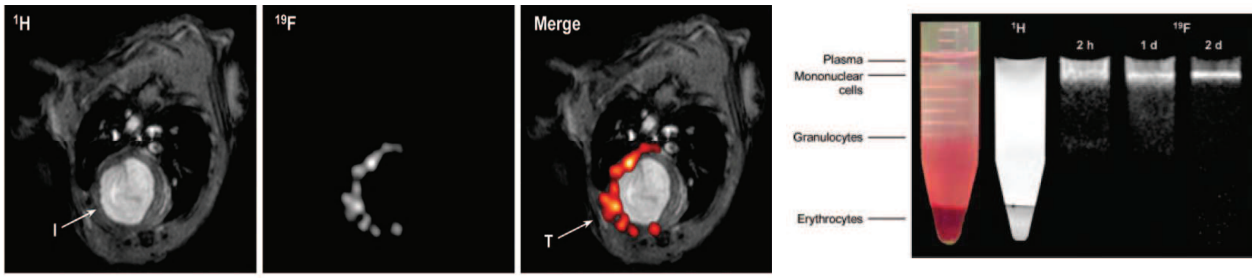
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- 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.

De meest voorkomende verworven hartziekte is een hartinfarct. Hierbij kan verstopping van één van de kransslagaders leiden tot afsterving en dysfunctioneren van een gedeelte van het hart. De ontstekingsprocessen die volgen op een hartinfarct zijn essentieel voor herstel van het hartweefsel, echter, overactieve of langdurige ontstekingsreacties kunnen ook leiden tot permanente schade aan het hart.
Het is daarom van groot belang om de locatie, de ernst en het tijdsverloop van de ontstekingsreactie in kaart te kunnen brengen om de behandeling van patienten te sturen en daarmee verslechtering van hartfunctie na een hartinfarct proberen te voorkomen.

Hoewel het mogelijk is om de ontstekingsgraad van het hart te bepalen met behulp van biopten of radioactieve tracers, is er een grote behoefte aan alternatieve, niet-invasieve en niet radioactieve technieken. In dit project willen wij op basis van magnetische resonantie beeldvorming (MRI) een nieuwe strategie onderzoeken die het mogelijk maakt om direct de ontstekingsgraad kwantitatief te kunnen volgen door gebruik te maken van ^{19}F (fluor) houdende MRI contrastmiddelen (vanaf hier '^{19}F nanodeeltjes' genoemd). Deze worden opgenomen door ontstekingscellen in de circulatie en daarna gerecruteerd naar locaties in het hart waar de ontstekingsreactie plaatsvindt. Omdat het lichaam van zichzelf geen fluor bevat, kunnen de MRI metingen zeer specifiek het signaal van de fluorhoudende ontstekingscellen detecteren. Daarnaast kunnen met MRI hoge-resolutie anatomische beelden van het hart zelf worden gemaakt, waardoor de locatie van de geaccumuleerde fluor nanodeeltjes heel nauwkeurig kan worden bepaald.

De mogelijkheid om met behulp ^{19}F MRI specifieke ophoping van ^{19}F nanodeeltjes te detecteren is eerder aangetoond (figuur 1). Tevens heeft men laten zien dat dit type nanodeeltjes specifiek worden opgenomen in monocyten, wat het een goede methode maakt om de ontstekingsgraad als gevolg van een hartinfarct te kunnen volgen (zie figuur 1). Echter, voordat een klinische translatie van deze techniek mogelijk wordt geacht om de ontstekingsprocessen in hartpatiënten **kwantitatief en over de tijd** te kunnen volgen, willen wij een aantal belangrijke facetten van deze techniek verder onderzoeken. Dit heeft betrekking op de optimale dosis, biodistributie en de **accuratesse van longitudinale metingen** met enkelvoudig of herhaalde toediening van de nanodeeltjes. Daarna willen we bestuderen hoe metingen van de ontstekingsrespons na een hartinfarct gebruikt kunnen worden om de hartfunctie op een later tijdstip te kunnen voorspellen. Tevens onderzoeken we of migratie van ontstekinsgcellen vanuit secundaire ontstekingsorganen (boijv. De milt) gedetecteerd kunnen worden en of het effect van ontstekingsremmende middelen op de ontstekingsreactie en de uiteindelijke hartfunctie gevoelig kan worden gekwantificeerd.



Figuur 1: detectie van ^{19}F nanodeeltjes in een muismodel van hartinfarct. (links) normaal anatomisch MRI beeld, samen met het ^{19}F specifiek MRI signaal en de overlay van beiden. (rechts) MRI metingen van bloedsamples die specifieke opname in onstekingscellen laten zien.
Flogel et al. Circulation. 2008;118:140-148

Dit project heeft zowel een translationeel als fundamenteel karakter, waar we aan de ene kant een platform ontwikkelen om op basis van MRI niet-invasieve metingen onstekingsprocessen in het hart te kwantificeren en aan de andere kant deze techniek kunnen gebruiken om meer inzicht te krijgen in hoe ontstekingsprocessen van invloed zijn op de hartfunctie. Het feit dat we met MRI longitudinale metingen kunnen doen in hetzelfde proefdier (en in de toekomst de patiënt) heeft een uiterst positief effect op de interpretatie van de verkregen resultaten, alsmede de translatie van deze techniek tot de kliniek.

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?

Algemeen doel: Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken.

Het project bevat de volgende subdoelen:

1. Optimalisatie en histologische validatie van kwantitatieve MRI metingen van ontsteking in het hart met behulp van ^{19}F nanodeeltjes (Experiment 1)

2. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen van ontsteking in het hart een voorspellende waarde hebben voor de hartfunctie op een later tijdstip (Experiment 2)

3. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen met 2 type nanodeeltjes migrerende ontstekingscellen (vanuit secundaire immunologische organen) kunnen onderscheiden van lokale cellen (Experiment 3)

4. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen het effect van ontstekingsremmende middelen na een hartinfarct kunnen detecteren.

Alle subdoelen worden beantwoord door middel van MRI metingen in een muismodel van ischemie/reperfusie en staan samen beschreven in bijlage 1.

Haalbaarheid: Onze afdeling heeft ruime ervaring met karakterisering van muismodellen met behulp van MRI [refs 1-3] en heeft beschikking over een eigen preklinische MRI faciliteit om de experimenten op te zetten en uit te voeren. Wij hebben specifieke ervaring met muismodellen van ischemie/reperfusie van het hart, alsmede met de benodigde biochemische technieken voor validatie van de MRI technieken.

Het project maakt deel uit van een recent toegekende STW Open Technologie subsidie ([redacted], €0.75M) over ^{19}F MRI beeldvorming van ontsteking in diermodellen van een hartinfarct. Er zijn derhalve voldoende financiële middelen om personeel aan te stellen en materiaal aan te schaffen om de geplande experimenten uit te voeren. Het project gaat in samenwerking met de Katholieke Universiteit Nijmegen, welke de benodigde ^{19}F nanodeeltjes zullen leveren, die volgens GMP procedures geproduceerd worden. Voor het project wordt een looptijd van 5 jaar ingeschat om optimalisatie en validatie van de MRI technieken en daaropvolgende deelonderzoeken uit te kunnen voeren.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk doel

Ondanks dat er veel onderzoek gedaan is naar de rol van ontstekingsprocessen in relatie tot hartfalen, zijn er geen goede manieren om deze op een non-invasieve manier te kwantificeren. In dit project wordt een platform onderzocht om dit door middel MRI beeldvorming in combinatie met ^{19}F nanodeeltjes te bewerkstelligen is. ^{19}F MRI metingen vereisen specialistische hardware en software implementaties, welke beschikbaar zijn in onze groep. De toepassing van deze nieuwe technologie in een klinisch relevante setting van hart- en vaatziekten zal een enorme boost geven om deze technologie verder te ontwikkelen en te verfijnen. Het niet invasief kunnen volgen van ontsteking als alternatief voor biopten of radioactieve beeldvormingstechnieken zal ook voor klinisch onderzoek op cardiovasculair gebied grote impact kunnen hebben en nieuwe mogelijkheden bieden om in klinische trials zowel de korte als lange termijn effecten van ontstekingsremmende therapieën te kunnen volgen.

Maatschappelijk doel

Hartaanvallen komen jaarlijks bij ~30,000 mensen voor in Nederland en door nieuwe interventies zoals dotteren is de overleving na een hartaanval enorm toegenomen in de afgelopen decennia. Een onbedoeld neveneffect van deze verbeterde overleving is de toename in hartfalen, die voor een groot deel te wijten is aan mensen die een hartaanval overleeft hebben, maar waarbij de hartfunctie niet volledig hersteld is.
Het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij infarctheling, met name de ontstekingsreactie, is van cruciaal belang om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen. In dit project wordt een nieuwe MRI techniek ontwikkeld met veelbelovende translatie naar de kliniek, waarmee ontstekingsprocessen in het hart gevolgd kunnen worden over de tijd. Hoewel patiënten met een hartinfarct een duidelijke doelgroep zijn voor het inzetten van deze technologie, zullen ook patiënten met myocarditis of een harttransplantatie (waar ontsteking een belangrijke rol speelt) hier enorm veel baat bij hebben.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

In dit project onderzoeken we een nieuwe MRI techniek om inflammatie in het hart na een hartinfarct te kunnen kwantificeren met behulp van ^{19}F MRI nanodeeltjes.

Het project bestaat uit 4 experimenten. In Experiment 1 willen we de MRI techniek om ontsteking in het hart te meten met behulp van ^{19}F nanodeeltjes optimaliseren en valideren. Hierbij wordt gekeken naar:

- de optimale dosis van de ^{19}F nanodeeltjes, hoog genoeg voor detectie van het ^{19}F MRI signaal in het infarctweefsel, maar laag genoeg om interferentie van achtergrondsignaal uit het bloed te voorkomen.
- de biodistributie van de ^{19}F nanodeeltjes in verschillende organen (hart, milt, lever, bloed)
- de correlatie van het in vivo gemeten ^{19F} MRI signaal met ex vivo verkregen MRI data, alsmede op histologie gebaseerde kwantificatie van ontstekingscellen.
- of de kwantificatie van ontsteking met ^{19}F MRI kan worden beïnvloed door de toegediende ^{19}F nanodeeltjes tijdens een voorafgaande MRI sessie.

Alleen als blijkt dat we met deze techniek de ontstekingsprocessen kwantitatief en longitudinaal kunnen volgen (**Go/no GO**), zullen de volgende experimenten worden uitgevoerd:

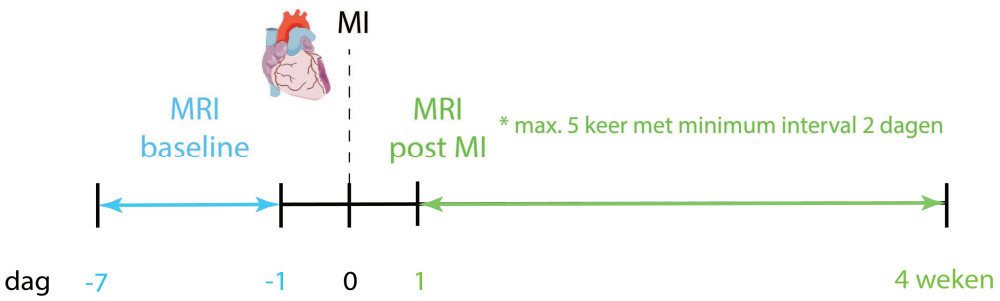
Experiment 2:
Het volgen van de ontstekingsrespons en de hartfunctie gedurende max 4 weken na ischemie/reperfusie en deze metingen te vergelijken met de hartfunctie vóór ischemie/reperfusie (baseline). Hieruit kunnen we bestuderen hoe metingen van de ontstekingsrespons een voorspellende waarde hebben voor het ontwikkelen van verminderde hartfunctie. Belangrijke waarden zijn hierbij het aantal ontstekingscellen in het hart als maat voor de ontstekingsrespons. Voor de hartfunctie zijn vooral metingen nodig om het linker ventrikel volume bij eind systole en diastole, wand dikte en ejectie fractie te kunnen berekenen.

Experiment 3:
Het is bekend dat ontstekingscellen vanuit de milt naar het hart kunnen migreren. In dit experiment onderzoeken we of met 2 onafhankelijk detecteerbare ^{19}F nanodeeltjes populaties van migrerende ontstekingscellen onderscheiden kunnen worden van lokale ontstekingscellen. Voor dit experiment wordt daarom één type nanodeeltje vóór inductie van het myocardinfarct toegediend (pre-loading). Hoewel het omhulsel van beide nanodeeltjes gelijk is, is er wel een verschil in de ingesloten fluor deeltjes. Hierdoor is er een verschil in MRI signalen die de deeltjes geven, waardoor ze afzonderlijk in hetzelfde dier gemeten kunnen worden. Voor een accurate interpretatie van dit experiment is het daarom noodzakelijk dat van beide deeltjes de dosis wordt geoptimaliseerd en de biodistributie wordt onderzocht zoals in experiment 1 wordt beschreven.

Experiment 4:
Onderzoeken of het mogelijk is het effect van ontstekingsremmende middelen (statines) na ischemie/reperfusie op de ontstekingsrespons te detecteren met 19F MRI gedurende max 4 weken. Hiervoor gebruiken we naast wildtype C57Bl6 muizen ook ApoE-/- muizen. Deze dieren zullen op een hoog cholesterol dieet worden gezet en daardoor atherosclerose ontwikkelen, wat gepaard gaat met een hogere ontstekingsrespons. Vervolgens wordt aan de ApoE-/- muizen statines toegediend. Statines verminderen lipiden in atherosclerose ,moduleren endotheel functie en bevatten een anti-inflammatoire rol. Ongeacht de aanwezigheid van een relatie tussen ontstekingsrespons en hartfunctie, verwachten we een effect van statines op ontstekingscellen en dit moet detecteerbaar zijn voor ^{19}F MRI.

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

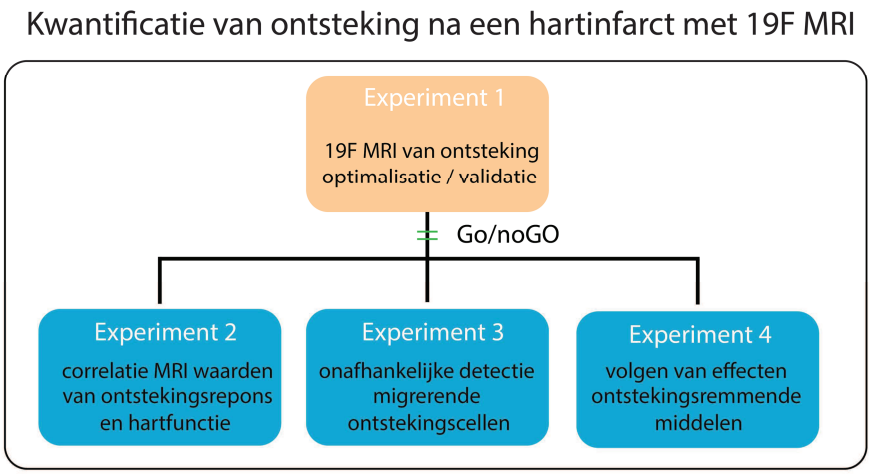
Type dierproef
In alle experimenten wordt gebruik gemaakt van een muismodel van een hartinfarct, wat geïnduceerd wordt door middel van een ischemie/reperfusie operatie. Hierbij wordt één van de coronair arteriën (LAD) gedurende 30 minuten geoccludeerd. Het gebruiken van een ischemie/reperfusie model is klinisch relevant, omdat dit overeenkomt met de situatie waarbij een patiënt na een infarct gedotterd wordt. Ook gaat de repefusie gepaard met een hogere mate van ontsteking en blijft het infarct gebied genoeg doorbloed, zodat de ^{19}F nanodeeltjes het infarct kunnen bereiken.



Figuur 2: tijdsschema ischemie/reperfusie operatie en MRI metingen

Type experimenten
De verschillende experimenten zoals beschreven in 3.4.1 bevatten allen dezelfde soort handelingen en staan meer uitvoerig beschreven in bijlage 3.4.4.1. Hierbij is de maximale duur van de experimenten 5 weken, waarbij maximaal éénmaal MRI wordt uitgevoerd op baseline (vanaf 1 week tot 1 dag voor inductie van het myocardinfarct) en maximaal 5 maal vanaf 1 dag tot en met 4 weken na inductie van het myocardinfarct (figuur 2). De toediening van de 19F nanodeeltjes vindt plaats 24 uur voorafgaande aan de MRI metingen. Na de laatste MRI meting worden de dieren opgeofferd voor histologische bepaling van ontstekingscellen.

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.



Figuur 3: samenhang en keuzemomenten van verschillende experimenten in het project.

Alle experimenten dragen bij aan de ontwikkeling van een nieuwe MRI methode om op een niet-invasieve manier ontstekingsprocessen in het hart na een hartinfarct te kwantificeren en meer inzicht te krijgen in hoe de ontstekingsrespons van invloed is op de hartfunctie op een later tijdstip (zie Figuur 3).

In Experiment 1 wordt de nieuwe MRI techniek voor het kwantificeren van ontsteking in het hart met 19F nanodeeltjes geoptimaliseerd en gevalideerd. Na Experiment 1 is een **keuzemoment** gedefinieerd. Alleen als de resultaten van Experiment 1 een goede correlatie laten zien tussen het gemeten ^{19}F MRI signaal en histologisch bepaalde hoeveelheid ontstekingscellen, worden deelexperimenten 2-4 uitgevoerd. Deze experimenten zullen aantonen of het meten van de ontstekingsrespons over de tijd een voorspellende waarde heeft voor de uiteindelijke hartfunctie en de effecten van therapie op de ontstekingsrespons gemeten kunnen worden. Voor experimenten 1D en 3 zullen beide soorten nanodeeltjes gebruikt worden. Voor de andere experimenten wordt maar 1 nanodeel type gebruikt. Het is van belang 2 deeltjes met een variërende frequentie te gebruiken zodat er een onderscheid gemaakt kan worden tijdens acquisitie tussen deeltjes die op onafhankelijke tijdstippen van elkaar zijn geïnjecteerd.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	MRI in een muismodel van ischemie/reperfusie van het hart
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

3.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

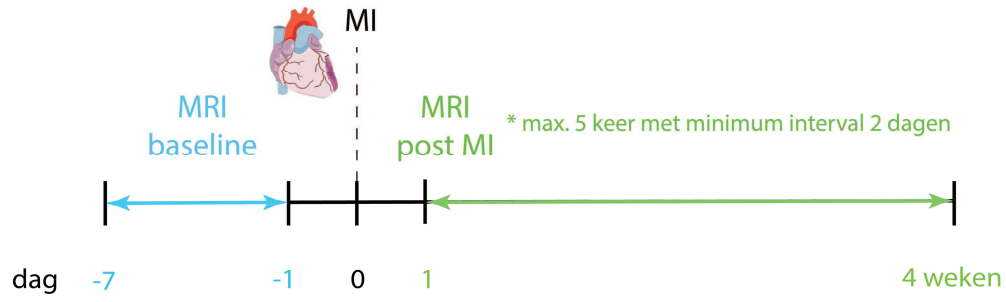
1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3.4.4.1 Type dierproef: MRI in een muismodel van ischemie/reperfusie van het hart

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het project bevat 4 verschillende experimenten. **Experiment 1** dient voor de ontwikkeling (optimalisatie en validatie) van een nieuwe MRI techniek en wordt uitgevoerd en beoordeeld voordat (**Go/noGO**) **Experimenten 2-4** aangevangen worden. Alle experimenten hebben de algemene opzet zoals beschreven in Figuur 1, waarbij tot maximaal 1 week vóór (baseline) en/of maximaal 5 maal na een myocardinfarct (MI) operatie (vanaf dag 1 tot max. 4 weken) MRI beeldvorming wordt uitgevoerd om hartfunctie te bepalen, alsmede voor karakterisatie van de ontstekingsrespons. Hiertoe wordt 24 uur voorafgaande aan een MRI meting een 19F (fluor) houdend MRI contrastmiddel toegediend, wat zich ophoopt in de ontstekingscellen en waarmee de ontstekingsgraad in het hart kan worden gekwantificeerd. Tussen opeenvolgende MRI metingen zit minimaal 2 dagen. Voor validatie zal gebruik worden gemaakt van histologie, immunofluorescentie microscopie en flow cytometrie.



Figuur 1: tijdsschema ischemie/reperfusie operatie en MRI metingen

Experiment 1. Ontwikkeling (optimalisatie en validatie) van kwantitatieve 19F MRI metingen van ontsteking in het hart

In dit experiment zullen we aantal aspecten van de nieuwe MRI techniek optimaliseren, alsmede valideren dat de MRI metingen een kwantitatieve relatie hebben tot histologische waarden van ontstekingsmarkers.
Hiervoor worden wildtype C57Bl6 muizen gebruikt. Hiervoor wordt niet altijd het gehele tijdsverloop van Figuur 1 gevolgd.

De volgende deelexperimenten zijn gedefinieerd:

A. Dosis optimalisatie 19F nanodeeltjes (dag 0 – dag 1)
Op basis van literatuur en MRI metingen van fluor oplossingen wordt een geschikte concentratiereeks gekozen waarin wij de kwantificatielimiet voor inflammatie kunnen bepalen met de reeds ontwikkelde MRI scantechnieken.
Na ischemie/reperfusie (dag 0) wordt ieder dier met een specifieke concentratie uit de concentratiereeks geïnjecteerd en vervolgens na 24 uur gescand met MRI. Wij kiezen dit tijdspunt omdat wij de initiële ontstekingsreactie op dag 1 willen kunnen detecteren. De optimale concentratie is de concentratie met het hoogste 19F MRI contrast tussen infarct en het bloed. Na de MRI meting worden de muizen opgeofferd.
De gevonden optimale dosis 19F nanodeeltjes wordt in de overige experimenten gebruikt.

B. Biodistributie 19F nanodeeltjes (dag 0 – 4 weken)
In dit experiment wordt de biodistributie (voornamelijk ophoping in lever, milt en eventueel lymfeklieren) van de 19F nanodeeltjes onderzocht in dieren met en zonder myocardinfarct en hoe het 19F MRI signaal in het infarct als functie van de tijd afneemt. Hiervoor worden 3 groepen muizen gebruikt: 1 ischemie/reperfusie groep, 1 sham groep en 1 controle groep om uit te sluiten dat de nanodeeltjes zelf een ontstekingsreactie veroorzaken. In dit experiment is de sham groep noodzakelijk om een goed beeld te krijgen van in hoeverre de biodistributie wordt beïnvloed door alleen de inflammatoire reactie na de infarct operatie zelf (incisie en hechting om het infarct te induceren). Ook geeft de sham groep waardevolle informatie over zowel de grootte als de plaats van het eventuele 19F MRI signaal van ontsteking enkel ten gevolge van de operatie en niet van het daadwerkelijke infarctweefsel. In dit experiment worden de 19F nanodeeltjes 1 maal toegediend op dag 0 en wordt maximaal 5 maal MRI gedaan. Na de laatste scan (4 weken) worden de dieren opgeofferd.

Er zijn 2 typen nanodeeltjes beschikbaar, die unieke MRI signalen geven en daarom afzonderlijk in hetzelfde dier gemeten kunnen worden (zie experiment 1D). Experimenten A en B wordt daarom voor beide deeltjes uitgevoerd. Voor een accurate interpretatie van experiment migratie cellen milt is het noodzakelijk dat van beide deeltjes de optimale dosis wordt toegepast en dat voor beide deeltjes de biodistributie bekend is.

C. Immunologische validatie (dag 0 – 4 weken)
Voor het implementeren van 19F MRI als valide methode om inflammatie te meten, moet eerst worden aangetoond dat het 19F MRI signaal in het infarct correleert met de histologisch bepaalde ontstekingswaarden. Hiervoor ondergaan de dieren een ischemie/reperfusie operatie op dag 0.
Om een grote range van ontstekingsgraad te garanderen (nodig voor validatie), worden voor verschillende dieren de 19F nanodeeltjes op verschillende tijdspunten toegediend en na 24 uur met MRI gemeten. Na de MRI scan worden de dieren opgeofferd voor histologische validatie. Het is van essentieel belang voor de voortgang van dit onderzoek dat de gemeten inflammatie onafhankelijk van tijd na MI correleert met de histologisch bepaalde inflammatie.

D. Interferentie nanodeeltjes (dag 0 – 1 week)
Om longitudinaal metingen te kunnen doen, is het van belang dat er meerdere keren in het totale traject een nanodeeltjes injectie wordt toegediend. In dit experiment willen we weten of het meerdere malen toedienen van de 19F nanodeeltjes invloed heeft op de kwantificatie waarden van de ontsteking. We willen hierbij onderzoeken of de ophoping van nanodeeltjes in het infarct weefsel als gevolg van een lange retentie tijd, invloed heeft op een follow up meting waarbij weer nanodeeltjes injectie plaatsvindt. De interferentie van de nanodeeltjes kan worden onderzocht door op verschillende tijdstippen na toediening van de 19F nanodeeltjes MRI scans te maken en gebruik te maken van 2 typen afzonderlijk detecteerbare nanodeeltjes.
De dieren worden maximaal 1 week gevolgd na ischemie/reperfusie (dag 0). Gedurende week 1 wordt

maximaal 3 maal MRI uitgevoerd (minimaal interval 48 uur) en worden maximaal 2 maal 19F nanodeeltjes toegediend (24 uur vóór MRI). Na de laatste MRI scan worden de dieren opgeofferd en gebruikt voor histologie. Dit experiment zal uitwijzen wat het minimale interval is waarop de 19F nanodeeltjes toegediend kunnen worden om de ontsteking na een infarct longitudinaal te kunnen volgen.

Experimenten 2-4 worden uitgevoerd mits uit Experiment 1 is gebleken dat wij door toediening van 19F nanodeeltjes de ontstekingsrespons op een kwantitatieve manier kunnen volgen over de tijd.
Deze experimenten zullen ons meer informatie verschaffen over hoe metingen van de ontstekingsrespons na een infarct informatie kunnen geven over het effect op de hartfunctie.

Experiment 2. Correlatie ^{19}F MRI meting ontstekingsrespons en hartfunctie (baseline / dag 0 – 4 weken)
In dit experiment willen we onderzoeken of ^{19}F MRI metingen van ontsteking een voorspellende waarde hebben voor de hartfunctie op een later tijdstip. Naast een groep die ischemie/reperfusie ondergaat, worden ook een controle en sham operatie groep gebruikt. In dit experiment is een sham ook noodzakelijk omdat enkel de inflammatie als gevolg van ischemie/reperfusie schade aan het hart in relatie moet worden gebracht met de hartfunctie op een later tijdstip. Hiermee kan worden nagegaan of inflammatie als gevolg van de operatie zelf (incisie en hechting om het infarct te induceren) een verstorende factor is in de associatie tussen myocard inflammatie en hartfunctie. Alle dieren worden gemeten volgens het schema in Figuur 1, met 1 MRI meting op baseline en maximaal 5 MRI metingen na ischemie/reperfusie. Er wordt een minimale rustperiode van 48uur tussen opeenvolgende MRI metingen toegepast. 24 uur vóór iedere MRI meting worden 19F nanodeeltjes toegediend om de ontstekingsrespons met MRI te kwantificeren. Na 4 weken worden de dieren opgeofferd en gebruikt voor histologie.

Experiment 3. Onafhankelijke detectie migrerende ontstekingscellen (baseline / dag 0 – 4 weken)
Met dit experiment willen we laten zien of we met de MRI metingen de mogelijke migratie van ontstekingscellen van de milt naar het hart kunnen kwantificeren. Hiervoor worden 19F nanodeeltjes 2 dagen vóór het infarct toegediend en wordt 1 dag voor het infarct MRI gedaan om ophoping van de nanodeeltjes in de milt te kwantificeren. Na ischemie/reperfusie worden de dieren maximaal 4 weken gevolgd met MRI (Figuur 1). Er zijn 4 groepen gedefinieerd, waarvan 3 groepen op verschillende dagen na ischemie/reperfusie een tweede type 19F nanodeeltje krijgt om onafhankelijk van de eerste toediening de ontsteking in het hart te kunnen meten met MRI. Na de laatste MRI meting worden de dieren opgeofferd en gebruikt voor histologische bepalingen van ontstekingscellen in het hart en milt.

Experiment 4. Volgen van effecten ontstekingsremmende middelen (baseline / dag 0 – 4 weken)
In dit experiment willen we laten zien of de MRI metingen het effect van ontstekingsremmende middelen (statines) kunnen kwantificeren en hoe deze middelen na een myocardinfarct invloed hebben op het tijdsverloop van de ontstekingsreactie en latere hartfunctie. De statines worden na het infarct via het drinkwater toegediend. De ontstekingsremmende middelen kunnen de ontsteking als gevolg van de operatie mogelijk ook beïnvloeden. Omdat we uiteindelijk de MRI metingen van de verlaagde ontsteking willen relateren aan veranderingen in de hartfunctie, moeten we ook een goed beeld hebben van het gemeten MRI signaal van ontsteking enkel als gevolg van de operatie.
Voor dit experiment worden naast wildtype C57BL6 dieren ook ApoE-/- dieren gebruikt die in combinatie met een hoog cholesterol dieet atherosclerose ontwikkelen, waardoor een situatie met verhoogde inflammatie wordt gecreëerd. Er zijn 3 groepen C57BL6 nodig (ischemie/reperfusie / sham / controle) die behandeling met statines ondergaan en 6 groepen ApoE-/- nodig (wel of geen behandeling). In de ApoE-/- wordt een verhoogde inflammatie verwacht in het myocard-infarct-weefsel. Om een eventueel verhoogde inflammatie als gevolg van de operatie uit te sluiten, zal voor deze groepen muizen ook een sham operatie noodzakelijk zijn. Alle dieren worden gemeten volgens het schema in Figuur 1, met 1 MRI meting op baseline en maximaal 5 MRI metingen na ischemie/reperfusie. 24 uur vóór iedere MRI meting worden 19F nanodeeltjes toegediend om de ontstekingsrespons met MRI te kwantificeren. Na 4 weken worden de dieren opgeofferd en gebruikt voor histologie.

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.

Ischemie/reperfusie operatie
In de infarct groepen uit Experimenten 1-4 wordt ischemie/reperfusie toegepast door tijdelijke occlusie (30 min) van de LAD coronair arterie. Hierbij wordt een ligatuur om de arterie geplaatst en aangetrokken om ischemie te induceren gedurende 30 min. en vervolgens weer losgemaakt voor reperfusie. Voorafgaande aan de operatie worden de dieren onder algehele narcose gebracht met adequate analgesie peri-operatief, waarna de dieren worden geïntubeerd. Verder wordt de muis peri-operatief warm gehouden om hypothermie te voorkonen.

Om de mate van ontsteking als gevolg van de directe operatieve handelingen (onafhankelijk van ischemie) te bepalen, zijn in experimenten 1B, 2 en 4 ook sham groepen toegevoegd. Hierbij wordt ook een ligatuur aangebracht om de LAD coronair arterie, echter wordt deze niet aangetrokken.

MRI
Voorafgaand aan en tijdens MRI worden de dieren onder anesthesie gebracht m.b.v. een inhalatie anestheticum. De temperatuur van het dier wordt gemeten met een rectal probe, terwijl de temperatuur in de MRI constant wordt gehouden met warme lucht. In het geval infarctgrootte wordt bepaald met MRI wordt vóór de MRI sessie onder algehele anaesthesie een katheter aangelegd in de staartvene voor injectie van een standaard klinisch contrastmiddel tijdens de MRI sessie (niet specifieke ophoping in infarct gebied). Vervolgens wordt het dier in de MRI scanner geplaatst. Een MRI sessie duurt maximaal 2.5 uur, waarin de volgende metingen gedaan kunnen worden:

- Voorbereidende scans om de goede oriëntatie van de volgende scans te bepalen.
- Hartfilmpjes op verschillende hoogtes (base tot apex) van het hart voor bepaling van de hartfunctie.
- Contrast-versterkte scans van het hart (15 min na toediening standaard klinisch contrastmiddel) om infarctgrootte te bepalen.
- ^{19}F (fluor) metingen van ontsteking in het hart door ophoping van ~~reeds~~ toegediende ^{19}F nanodeeltjes te kwantificeren. Dit is de methode die we verder willen ontwikkelen, waarvan de optimalisatie in Experiment 1 wordt beschreven.

De muizen worden maximaal 6 keer binnen 5 weken (inclusief baseline) gescand met minimaal 48uur tussen opeenvolgende scans (zie Figuur 1). Dit is nodig om longitudinaal een verband te kunnen leggen tussen het gemeten 19F MRI signaal en het verloop van de inflammatie. Tijdens de MRI sessie wordt de temperatuur van de muis gemonitord met een rectal probe en wordt de temperatuur in de MRI constant gehouden met behulp van warme lucht. Na de laatste MRI meting, worden de muizen opgeofferd voor histologische validatie met behulp van NMR spectroscopie, immunofluorescentie microscopie en/of flow cytometrie.

Toediening ^{19}F (fluor) nanodeeltjes
Fluor houdende MRI contrastmiddelen (^{19}F nanodeeltjes) worden geïnjecteerd via een katheter, aangebracht in de staart vene. Dit gebeurt 24 uur voor aanvang van iedere MRI sessie (Figuur 1). In het geval op dag 1 na ischemie/reperfusie MRI wordt gedaan, zal de toediening van ^{19}F nanodeeltjes plaatsvinden vlak na de operatie voordat de dieren uit de anesthesie zijn.

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

Voor sommige experimenten wordt gebruikt gemaakt van de formule van Sachs die het benodigd aantal dieren berekend aan de hand van het verwachte effect (δ) en de verwachte spreiding (σ) tussen de dieren in dezelfde groep. Wij hanteren een significantie level van 0.05 en een power van 0.8, wat een F-waarde geeft van 15.7 Hierdoor wordt het aantal dieren gegeven bij gebruik van de formule van sachs gegeven door:

$n = 15{,}7 * (\sigma/\delta)^2$

Experiment 1. Ontwikkeling (optimalisatie en validatie) van kwantitatieve 19F MRI metingen van ontsteking in het hart

A. Dosis optimalisatie ^{19}F *nanodeeltjes*

Voor een goede detectiecurve die ons de optimale dosis geeft voor de toegediende ^{19}F *nanodeeltjes denken wij n = 15 dieren nodig te hebben.*

B. Biodistributie ^{19}F *nanodeeltjes*
De distributie van nanodeeltjes wordt bepaald door de dieren meerdere keren te scannen (dag 0 – 4 weken). Doordat er geen groepen muizen per tijdstip worden opgeofferd is het aantal benodigde dieren minimaal. Er worden **3** groepen dieren gebruikt (ischemie/reperfusie, sham en controle). Op basis van eerdere ervaringen passen wij uitvalspercentages van respectievelijk **30%**, **20%** en **10%** toe. Dit houdt rekening met complicaties tijdens en na de ischemie/reperfusie (of sham) operatie, maar ook de mogelijke onbruikbaarheid van de MRI data. Per groep zijn **10** muizen nodig om de variatie in biodistributie goed te kunnen schatten. Het volgende aantal dieren zijn dus nodig:
Ischemie/reperfusie: (n – **0.3**n) = **10**; n = 15
Sham: (n – **0.2**n) = **10**; n = 13
Controle: (n – **0.1**n) = **10**; n = 12

Totaal: n = 40.

C. Immunologische validatie
Voor de immunologische validatie worden MRI resultaten vergeleken met histologische waarden van ontsteking. Voor ieder dier vindt MRI plaats op 1 dag, maar om een range in ontstekingswaarden te garanderen (nodig voor validatie) kan de precieze dag varieren tussen 0 – 4 weken na ischemie/reperfusie.
Om de correlatie tussen MRI en histologisch waarde nauwkeurig te kunnen bepalen, denken wij **30** dieren nodig te hebben. Voor deze groep wordt een uitvalspercentage van **30%** gehanteerd.
Dit geeft dus: (n- **0.3**n) = **30**; n = 43

D. Interferentie nanodeeltjes
Er zijn **3** groepen dieren nodig waarbij iedere groep een andere combinatie van MRI scandagen (en toediening 19F nanodeeltjes) heeft. Om de interferentie van de deeltjes voor opeenvolgende metingen te kunnen bepalen moet een verschil in MRI signaal tussen de groepen kunnen worden opgepikt. Het minimaal te detecteren effect moet 20% zijn, maar we verwachten dat de spreiding ook 20% is.
Met gebruik van de formule van Sachs komen we dan op $15{,}7 * (20/20)^2 =$ **16** dieren per groep.
Voor deze groepen wordt een uitvalspercentage van **30%** gehanteerd.
Dit geeft dus: (1/**3**)*(n – **0.3**n) = **16**; n = 69

Er zijn **2** typen nanodeeltjes beschikbaar, die unieke MRI signalen geven en daarom afzonderlijk in hetzelfde dier gemeten kunnen worden (zie experiment 1D). Experiment 1A en 1B wordt daarom voor beide deeltjes uitgevoerd.

Het totaal aantal dieren voor Experiment 1 komt daarmee op **2***(15+40) + 43+ 69 = 222.

Experiment 2,3 en 4
Ons onderzoek is gericht op metingen van inflammatie in het hart om zodoende de ontwikkeling van hartfalen na een infarct beter te begrijpen. Hiervoor willen we verschillen in ontsteking (minimaal 20%) als functie van de tijd kunnen detecteren. Wel verwachten we dat de spreiding in de groepen m.b.t. de ontsteking ook groot zal zijn (20%).

Met behulp van de formule van Sachs is de groepsgrootte bepaald op n = 16 dieren.
In onderstaande tabel staan per experiment het aantal ischemie/reperfusie, sham en controle groepen

		Ischemie/ reperfusie	Sham	Controle
Experiment 2	C57Bl/6	1	1	1
Experiment 3	C57Bl/6	4		
Experiment 4	C57Bl/6	1	1	1
	C57Bl/6 ApoE-/-	2	2	2

De groepen (ischemie/reperfusie, sham, controle) hebben een respectievelijk uitvalspercentage van **30%**, **20%** en **10%,** uitgaande van uitval tijdens ischemie/reperfusie of tijdens het verdere tijdsverloop van de MRI metingen, wat respectievelijk een groepsgrootte geeft van 23, 20 en 18 dieren.

Dit geeft een totaal aantal dieren van:

		Ischemie/ reperfusie	Sham	Controle
Experiment 2	C57Bl/6	23	20	18
Experiment 3	C57Bl/6	92		
Experiment 4	C57Bl/6	23	20	18
	ApoE-/-	46	40	36

De optimalisatie van de MRI techniek in Experiment 1 voorkomt dat wij Experimenten 2-4 moeten herhalen met verschillende typen 19F nanodeeltjes. Hierdoor wordt het totale aantal dieren sterk verminderd.

B. De dieren

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

Diersoorten en levensstadia
In dit onderzoek willen we muizen gebruiken tussen de 8 en 11 weken. Dit zijn volwassen muizen die standaard worden gebruikt voor onderzoek in hartfalen. Verder is het immuunsysteem van de muis voldoende te vergelijken met dat van de mens. Voor de meeste experimenten gebruiken we wildtype C57Bl6 muizen. Alleen voor de deelonderzoeken met statine behandeling (Experiment ~~3~~ 4) zullen we ApoE-/- muizen gebruiken, omdat dit muizenmodel een atherosclerose model is met een verhoogde inflammatie en waarop een statine behandeling een duidelijk effect zal weergeven.

Geslacht
In dit onderzoek worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt. De diversiteit in de ontstekingsrespons als gevolg van verschillen in geslacht is geen probleem in dit onderzoek omdat door de longitudinale metingen elk dier ook zijn eigen controle is.

Herkomst
De muizen worden besteld bij een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf.

Geschatte aantallen
Voor gedetailleerd uitleg, zie boven.

Er zijn in totaal 436 C57BL/6 muizen nodig.
Er zijn in totaal 122 C57BL/6 ApoE-/- muizen nodig.
Het totaal aantal muizen voor dit project komt dan uit op **558**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging. De nanoparticles zijn eerst in vitro getest op celkweek. Hierbij is vastgesteld dat de nanodeeltjes worden opgenomen door ontstekingscellen en dat de functie en fenotype van de ontstekingscellen niet worden beïnvloed door de nanodeeltjes. In ons onderzoek willen we laten zien dat we de ontstekingsrespons na een myocardinfarct longitudinaal kunnen volgen en kwantificeren met niet-invasieve MRI technieken. Dit kan alleen gebruik makend van in vivo studies.

Vermindering. Doordat in vivo longitudinaal wordt gemeten zijn er minder muizen per groep nodig dan het geval zou zijn als bij elk tijdstip de muizen getermineerd moeten worden voor histologische weefsel analyse. Verder is voor iedere groep dieren een inschatting gemaakt van de het minimale gewenste effect en de verwachte spreiding en hier is het aantal dieren op aangepast.

Verfijning. Dit onderzoek wordt uitgevoerd met C57Bl6 muizen die standaard voor hartonderzoek wordt gebruikt. Ook het immuunsysteem van de muis is voldoende vergelijkbaar met dat van de mens om de resultaten van dit onderzoek transleerbaar te maken naar de mens. Verder is het mogelijk de genen geassocieerd met hartfalen te manipuleren in een muismodel en de invloed van genen op de ontstekingsreactie na een hartinfarct te onderzoeken.

Alle handelingen met dieren worden uitgevoerd door ervaren biotechnici om zo het ongerief van het dier per handeling zo laag mogelijk te houden. De handelingen beschreven in dit project staan beschreven in de literatuur en geven betrouwbare data. MRI is de gouden standaard methode voor de evaluatie van hartfunctie in diermodellen. Op dit moment hanteren wij maximaal 2.5 uur (vanaf narcose inductie) om alle benodigde informatie met voldoende kwaliteit te kunnen meten. Wij werken echter continue aan nieuwe MRI methodologie om scanprotocollen sneller te maken. Om uitdroging tijdens de MRI sessie te voorkomen wordt subcutaan vocht toegediend. Ook wordt oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te voorkomen.

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.

Naast het vervangen, verminderen en verfijnen van de dierproeven om het totale ongerief van de dieren te verminderen, worden ook maatregelen genomen om de pijn, lijden en angst bij dieren te beperken zoals:

- Voordat met experimenten wordt begonnen, zullen we de dieren laten acclimatiseren aan de huisvesting en de handelingen van de onderzoeker.
- De dieren uit één groep worden zoveel mogelijk samen gehuisvest, nadat alle dieren met randomisatie worden ingedeeld in groepen. Het dag-nacht ritme wordt ook omgedraaid zodat de dieren in de avond slapen en overdag gescand kunnen worden.

- De dieren worden dagelijks gecontroleerd en ook tijdens de experimenten gecontroleerd op gedrag of lichaamsverschijnselen die duiden op discomfort.
- Pijnbestrijding bij ischemie/reperfusie wordt peri-operatief gegeven.

MRI wordt gedaan onder anesthesie (isofluraan), waardoor de dieren geen last ondervinden van de MRI sessies. Ook wordt tijdens de MRI sessie de temperatuur, ademhaling en hartslag bijgehouden om te toestand van het dier te monitoren. Het bijkomen uit de anesthesie na de MRI sessie kan licht ongerief geven, daarom laten we dieren bijkomen in een recovery chamber.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Het induceren van een myocardinfarct alsmede de sham operatie geeft matig ongerief als gevolg van 1-2

dagen post-operatieve pijn. Daarom wordt de operatie verricht onder narcose en worden de dieren met pijnstilling behandeld. Hierbij worden pijnstilling gebruikt dat zo min mogelijk effect heeft op de ontstekingsprocessen. In de andere experimenten wordt geen pijn verwacht.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1) Het myocard infarct kan gewichtsverlies, verminderde activiteit en kortademigheid veroorzaken en ontstaat sporadisch infectie van de wond
2) Na de sham operatie kan infectie van de wond ontstaan.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1) De operatie voor het induceren van het myocardinfarct en het myocardinfarct zelf.
2) De sham operatie (wel ligatuur, geen ischemie).

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

Als de geopereerde muizen door verminderde activiteit last ondervinden van kooigenoten, zullen deze muizen tijdelijk apart worden gehuisvest. De dieren worden goed gemonitord en er wordt op gelet dat de humane eindpunten niet worden overgeschreden (zie punt J).

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.

Aan het eind van elk experiment worden de dieren opgeofferd. De dieren ontwaken na de laatste MRI metingen niet meer uit de anesthesie en worden opgeofferd middels perfusie-fixatie.

Humane eindpunten zijn: ernstig bloedverlies tijdens myocardinfarct (of sham) operatie of tekenen van ernstig ongerief na operatie verlies van 15% van het lichaamsgewicht ten opzichte van gewicht voor operatie, infectie van de wond, kortademigheid, uitdrogingsverschijnselen of hoog op de pootjes, bolle rug, ruwe vacht en/of inactief.

De (vervanger) verantwoordelijke onderzoeker en ARIA medewerkers zullen toezicht houden op de dieren.

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

We verwachten dat ongeveer 15% van de dieren de kans lopen 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.

Cumulatief ongerief	**Percentage dieren**	**Ingrepen**	**Groepen**
Licht	17.4%	-MRI -Injectie contrast -Anesthesie -Euthanasie onder verdoving	1B controle 2 controle 4 controle
Matig	82.6%	-Ischemie/reperfusie	1A

		of sham operatie -MRI -Injectie contrast -Anesthesie -Euthanasie onder verdoving	1B sham en IR operatie 1C 1D 2 sham en IR operatie 3 4 sham en IR operatie

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.

Aan het einde van de proef is het essentieel om de dieren te doden, omdat de organen nodig zijn voor histologische validatie.

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

24 mei 2016

4.

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

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

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project **Kwantificatie van ontsteking na een hartinfarct met ^{19}F MRI**

3. Titel van de NTS Het meten van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ ~~wijziging van vergunning met nummer~~

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken 13-07-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Afstemming IvD
   De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
     Verstrekt(e) antwoord(en
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord

- Verstrekt(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben ~~wel/~~niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   >Ja
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

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

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken) en kan getypeerd worden als een project met vier subdoelen waarvan na het slagen van experiment 1 de volgende drie onderling geen relatie of tijdsafhankelijkheid hebben. De vier subdoelen zijn: 1. Optimalisatie en histologische validatie van kwantitatieve MRI metingen van ontsteking in het hart met behulp van ^{19}F nanodeeltjes (Experiment 1), 2. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen van ontsteking in het hart een voorspellende waarde hebben voor de hartfunctie op een later tijdstip (Experiment 2), 3. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen met 2 type nanodeeltjes migrerende ontstekingscellen (vanuit secundaire immunologische organen) kunnen onderscheiden van lokale cellen (Experiment 3), 4. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen het effect van ontstekingsremmende middelen na een hartinfarct kunnen detecteren
   De vier subdoelen dragen ieder bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De vier subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt en elk subdoel levert een bijdrage aan het hoofddoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.
   Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

   > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
   > De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek en toegepast gedaan naar Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

> Het directe doel van het project is het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken

Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

   > De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten met deze 19F MRI nanodeeltjes methode na hartschade gescand kunnen worden in de MRI.
   > Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren enige stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.
   > Waarden voor mensen zijn dat door het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij de heling na een infarct, met name de ontstekingsreactie, van cruciaal belang is om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt

worden door specifieke wetgeving.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).*
   > De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

   De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het voorgestelde ziektemodel en met metingen mbv de MRI bij kleine proefdieren. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven te kunnen uitvoeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6)*.

   > De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Alle experimenten dragen bij aan de ontwikkeling van een nieuwe MRI methode om op een niet-invasieve manier ontstekingsprocessen in het hart na een hartinfarct te kwantificeren en meer inzicht te krijgen in hoe de ontstekingsrespons van invloed is op de hartfunctie op een later tijdstip Na optimalisatie en validatie van de nieuwe MRI techniek voor het kwantificeren van ontsteking in het hart is een keuzemoment voor de vervolgexperimenten. Alleen als de resultaten van Experiment 1 een goede correlatie laten zien tussen het gemeten ^{19}F MRI signaal en histologisch bepaalde hoeveelheid ontstekingscellen, worden deelexperimenten 2-4 uitgevoerd.
   De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

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

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

   ☐ Niet-menselijke primaten (10e)

   ☐ Dieren in/uit het wild (10f)

   ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

   ☐ Zwerfdieren (10h)

   ☐ Hergebruik (1e, lid 2)

☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

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

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

> Er is voldaan aan bijlage III

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

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

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

> De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermin-king of ontneming van soortspecifieke eigenschappen. Echter de ziektemodellen induceren wel ernstige pijn (reumamodellen; opgezwollen gewrichten) of langdurig ongerief (verlammingsverschijnselen achterpoten in MS model) waardoor het natuurlijke gedrag van het dier belemmerd zal worden.

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

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren (<15%) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per experiment, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
> De nanoparticles zijn eerst in vitro getest op celkweek. Hierbij is vastgesteld dat de nanodeeltjes worden opgenomen door ontstekingscellen en dat de functie en fenotype van de ontstekingscellen niet worden beïnvloed door de nanodeeltjes. In ons onderzoek willen we laten zien dat we de ontstekingsrespons na een myocardinfarct longitudinaal kunnen volgen en kwantificeren met niet-invasieve MRI technieken. Dit kan alleen gebruik makend van in vivo studies..

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

> Voor de experimenten (behalve optimalisatie en biodistributie in exp 1) wordt gebruikt gemaakt van de formule van Sachs die het benodigd aantal dieren berekend aan de hand van het verwachte effect (δ) en de verwachte spreiding (σ) tussen de dieren in dezelfde groep. Wij hanteren een significantie level van 0.05 en een power van 0.8, wat een F-waarde geeft van 15.7 Hierdoor wordt het aantal dieren gegeven bij gebruik van de formule van sachs gegeven door:

$n = 15{,}7 * (\sigma/\delta)^2$

In experiment 1 wordt het aantal dieren voor de optimalisatie en biodistributie geschat op 30. Een power analyse is hier niet mogelijk

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

> Alle handelingen met dieren worden uitgevoerd door ervaren biotechnici om zo het ongerief van het dier per handeling zo laag mogelijk te houden. De handelingen beschreven in dit project staan beschreven in de literatuur en geven betrouwbare data. MRI is de gouden standaard-methode voor de evaluatie van hartfunctie in diermodellen. Op dit moment hanteren de onderzoekers maximaal 2.5 uur (vanaf narcose inductie) om alle benodigde informatie met voldoende kwaliteit te kunnen meten. Om uitdroging tijdens de MRI sessie te voorkomen wordt subcutaan vocht toegediend. Ook wordt oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te voorkomen.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.

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

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

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

> n.v.t.

NTS

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

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken het geringe en matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op *het* ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan hartfalen ten gevolge van ontsteking in het hart na een hartinfarct.

De 553 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen licht (17.4%), en matig (82,6%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten , welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig maar wel duidelijk aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken bij de mens.

Hoewel een substantieel aantal muizen matig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC

erkent dat het gekozen model het meest geschikte model is om deze MRI techniek in te ontwikkelen. Het maatschappelijk belang is dat het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij de heling van een hartinfarct, met name de ontstekingsreactie dat een gevolg is van het infarct, is van cruciaal belang om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen. In dit project wordt een nieuwe MRI techniek ontwikkeld met veelbelovende translatie naar de kliniek, waarmee ontstekingsprocessen in het hart gevolgd kunnen worden over de tijd. Hoewel patiënten met een hartinfarct een duidelijke doelgroep zijn voor het inzetten van deze technologie, zullen ook patiënten met myocarditis of een harttransplantatie (waar ontsteking een belangrijke rol speelt) hier enorm veel baat bij hebben.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Voor de DEC weegt voor het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken op tegen het lichte en matige ongerief van 553 muizen. De DEC vindt dat het ontwikkelen van de nieuwe techniek voor toepassing van de MRI bij het meten van ontstekingsprocessen in beschadigde harten maatschappelijke positieve gevolgen heeft omdat het een niet invasieve techniek is waarmee eerder dan met de huidige technieken, ontsteking kan worden gemeten en therapieën kunnen worden gegeven en het effect kan worden gevolgd om deze ontstekingsreactie tegen te gaan. Door deze ontstekingsreactie te remmen kan hartfalen worden voorkomen .

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek.

Om dit doel te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt wordt door het nabootsen van de ziekte. De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een hartinfarctmodel. Dit weegt mee in de afweging tussen het licht en matige ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk).

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

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

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

      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…

      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Tijdens de beoordeling zijn geen knelpunten naar voren gekomen

Centrale Commissie Dierproeven

5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171664

Bijlagen
2

Datum 4 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 augustus 2017. Het gaat om uw project "Kwantificatie van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020171664. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
4 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171664

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
4 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171664

Gegevens aanvrager

Uw gegevens	
Deelnemersnummer NVWA:	11800
Naam instelling of organisatie:	Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	343362777
Straat en huisnummer:	Meibergdreef 31
Postcode en plaats:	1105 AZ AMSTERDAM
IBAN:	[redacted]
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	AMC Amsterdam

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker	
Naam:	[redacted]
Functie:	Universitair Docent (UD)
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Datum:
4 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171664

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam:	[redacted]
Functie:	Onderzoeker in opleiding (OIO)
Afdeling:	[redacted]
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	[redacted]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 september 2017
Geplande einddatum:	1 september 2022
Titel project:	Kwantificatie van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI
Titel niet-technische samenvatting:	Het meten van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met MRI
Naam DEC:	DEC AMC
Postadres DEC:	Meibergdreef [redacted] 1105 AZ Amsterdam
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Datum:
4 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171664

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	2 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171664

Bijlagen
2

Datum 4 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 4 augustus 2017
Vervaldatum: 3 september 2017
Factuurnummer: [redacted]
Ordernummer: Kostenplaatsnummer: [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1180020171664	€ 1035,-

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

6.

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: dinsdag 29 augustus 2017 11:09
Aan: [redacted]
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD1180020171664

Geachte DEC AMC,
Dank voor uw nieuwe advies wat wij 18 augustus 2017 hebben ontvangen. Hierin staat echter nog hetzelfde antwoord voor C12. Kunt u een nieuw advies sturen waarin dit antwoord is aangepast naar onderliggende aanvraag?

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

Met vriendelijke groeten,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

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

Van: info@zbo-ccd.nl [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: vrijdag 11 augustus 2017 11:32
Aan: [redacted]
Onderwerp: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD1180020171664

Geachte DEC AMC,

Op 02-08-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Kwantificatie van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI' met aanvraagnummer AVD1180020171664.

Wilt u een nieuw advies sturen over deze aanvraag, waarin u het antwoord op C12 heeft aangepast naar onderliggende aanvraag?
Kunt u daarnaast aangeven of u de ethische afweging hebt gedaan op basis van 558 dieren? In uw advies staat dat het 553 dieren betreft, in de aanvraag staat 558 dieren genoemd.

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

Met vriendelijke groet,

[redacted]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

24 mei 2016

7.

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

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

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project **Kwantificatie van ontsteking na een hartinfarct met ^{19}F MRI**

3. Titel van de NTS Het meten van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ ~~wijziging van vergunning met nummer~~

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken 13-07-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Afstemming IvD
   De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
     Verstrekt(e) antwoord(en
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord

- Verstrekt(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben ~~wel/~~niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   >Ja
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

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

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken) en kan getypeerd worden als een project met vier subdoelen waarvan na het slagen van experiment 1 de volgende drie onderling geen relatie of tijdsafhankelijkheid hebben. De vier subdoelen zijn: 1. Optimalisatie en histologische validatie van kwantitatieve MRI metingen van ontsteking in het hart met behulp van ^{19}F nanodeeltjes (Experiment 1), 2. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen van ontsteking in het hart een voorspellende waarde hebben voor de hartfunctie op een later tijdstip (Experiment 2), 3. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen met 2 type nanodeeltjes migrerende ontstekingscellen (vanuit secundaire immunologische organen) kunnen onderscheiden van lokale cellen (Experiment 3), 4. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen het effect van ontstekingsremmende middelen na een hartinfarct kunnen detecteren
   De vier subdoelen dragen ieder bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De vier subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt en elk subdoel levert een bijdrage aan het hoofddoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.
   Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

   > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
   > De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek en toegepast gedaan naar Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

> Het directe doel van het project is het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken

Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

   > De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten met deze 19F MRI nanodeeltjes methode na hartschade gescand kunnen worden in de MRI.
   > Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren enige stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.
   > Waarden voor mensen zijn dat door het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij de heling na een infarct, met name de ontstekingsreactie, van cruciaal belang is om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt

worden door specifieke wetgeving.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).*
   > De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

   De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het voorgestelde ziektemodel en met metingen mbv de MRI bij kleine proefdieren. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven te kunnen uitvoeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6)*.

   > De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Alle experimenten dragen bij aan de ontwikkeling van een nieuwe MRI methode om op een niet-invasieve manier ontstekingsprocessen in het hart na een hartinfarct te kwantificeren en meer inzicht te krijgen in hoe de ontstekingsrespons van invloed is op de hartfunctie op een later tijdstip Na optimalisatie en validatie van de nieuwe MRI techniek voor het kwantificeren van ontsteking in het hart is een keuzemoment voor de vervolgexperimenten. Alleen als de resultaten van Experiment 1 een goede correlatie laten zien tussen het gemeten ^{19}F MRI signaal en histologisch bepaalde hoeveelheid ontstekingscellen, worden deelexperimenten 2-4 uitgevoerd.
   De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

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

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

   ☐ Niet-menselijke primaten (10e)

   ☐ Dieren in/uit het wild (10f)

   ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

   ☐ Zwerfdieren (10h)

   ☐ Hergebruik (1e, lid 2)

☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

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

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

> Er is voldaan aan bijlage III

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

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

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

> De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermin-king of ontneming van soortspecifieke eigenschappen. Echter de ziektemodellen induceren wel ernstige pijn (reumamodellen; opgezwollen gewrichten) of langdurig ongerief (verlammingsverschijnselen achterpoten in MS model) waardoor het natuurlijke gedrag van het dier belemmerd zal worden.

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

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren (<15%) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per experiment, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
> De nanoparticles zijn eerst in vitro getest op celkweek. Hierbij is vastgesteld dat de nanodeeltjes worden opgenomen door ontstekingscellen en dat de functie en fenotype van de ontstekingscellen niet worden beïnvloed door de nanodeeltjes. In ons onderzoek willen we laten zien dat we de ontstekingsrespons na een myocardinfarct longitudinaal kunnen volgen en kwantificeren met niet-invasieve MRI technieken. Dit kan alleen gebruik makend van in vivo studies..

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

> Voor de experimenten (behalve optimalisatie en biodistributie in exp 1) wordt gebruikt gemaakt van de formule van Sachs die het benodigd aantal dieren berekend aan de hand van het verwachte effect (δ) en de verwachte spreiding (σ) tussen de dieren in dezelfde groep. Wij hanteren een significantie level van 0.05 en een power van 0.8, wat een F-waarde geeft van 15.7 Hierdoor wordt het aantal dieren gegeven bij gebruik van de formule van sachs gegeven door:

$n = 15{,}7 * (\sigma/\delta)^2$

In experiment 1 wordt het aantal dieren voor de optimalisatie en biodistributie geschat op 30. Een power analyse is hier niet mogelijk

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

> Alle handelingen met dieren worden uitgevoerd door ervaren biotechnici om zo het ongerief van het dier per handeling zo laag mogelijk te houden. De handelingen beschreven in dit project staan beschreven in de literatuur en geven betrouwbare data. MRI is de gouden standaard-methode voor de evaluatie van hartfunctie in diermodellen. Op dit moment hanteren de onderzoekers maximaal 2.5 uur (vanaf narcose inductie) om alle benodigde informatie met voldoende kwaliteit te kunnen meten. Om uitdroging tijdens de MRI sessie te voorkomen wordt subcutaan vocht toegediend. Ook wordt oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te voorkomen.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.

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

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

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

> n.v.t.

NTS

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

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken het geringe en matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op *het* ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan hartfalen ten gevolge van ontsteking in het hart na een hartinfarct.

De 558 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen licht (17.4%), en matig (82,6%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten , welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig maar wel duidelijk aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken bij de mens.

Hoewel een substantieel aantal muizen matig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC

erkent dat het gekozen model het meest geschikte model is om deze MRI techniek in te ontwikkelen. Het maatschappelijk belang is dat het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij de heling van een hartinfarct, met name de ontstekingsreactie dat een gevolg is van het infarct, is van cruciaal belang om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen. In dit project wordt een nieuwe MRI techniek ontwikkeld met veelbelovende translatie naar de kliniek, waarmee ontstekingsprocessen in het hart gevolgd kunnen worden over de tijd. Hoewel patiënten met een hartinfarct een duidelijke doelgroep zijn voor het inzetten van deze technologie, zullen ook patiënten met myocarditis of een harttransplantatie (waar ontsteking een belangrijke rol speelt) hier enorm veel baat bij hebben.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Voor de DEC weegt voor het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken op tegen het lichte en matige ongerief van 553 muizen. De DEC vindt dat het ontwikkelen van de nieuwe techniek voor toepassing van de MRI bij het meten van ontstekingsprocessen in beschadigde harten maatschappelijke positieve gevolgen heeft omdat het een niet invasieve techniek is waarmee eerder dan met de huidige technieken, ontsteking kan worden gemeten en therapieën kunnen worden gegeven en het effect kan worden gevolgd om deze ontstekingsreactie tegen te gaan. Door deze ontstekingsreactie te remmen kan hartfalen worden voorkomen .

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek.

Om dit doel te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt wordt door het nabootsen van de ziekte. De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een hartinfarctmodel. Dit weegt mee in de afweging tussen het licht en matige ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk).

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

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

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

      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…

      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Tijdens de beoordeling zijn geen knelpunten naar voren gekomen

24 mei 2016

8.

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

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

1. Aanvraagnummer

2. Titel van het project **Kwantificatie van ontsteking na een hartinfarct met ^{19}F MRI**

3. Titel van de NTS Het meten van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI

4. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ ~~wijziging van vergunning met nummer~~

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC DEC-AMC
   - telefoonnummer contactpersoon [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken 13-07-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

7. Afstemming IvD
   De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

8. Eventueel horen van aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
     Verstrekt(e) antwoord(en
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager n.v.t.
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord

- Verstrekt(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben ~~wel/~~niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) n.v.t.
    - Aard expertise
    - Deskundigheid expert
    - Datum verzoek
    - Strekking van het verzoek
    - Datum expert advies
    - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   >Ja
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

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

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken) en kan getypeerd worden als een project met vier subdoelen waarvan na het slagen van experiment 1 de volgende drie onderling geen relatie of tijdsafhankelijkheid hebben. De vier subdoelen zijn: 1. Optimalisatie en histologische validatie van kwantitatieve MRI metingen van ontsteking in het hart met behulp van ^{19}F nanodeeltjes (Experiment 1), 2. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen van ontsteking in het hart een voorspellende waarde hebben voor de hartfunctie op een later tijdstip (Experiment 2), 3. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen met 2 type nanodeeltjes migrerende ontstekingscellen (vanuit secundaire immunologische organen) kunnen onderscheiden van lokale cellen (Experiment 3), 4. Onderzoeken of ^{19}F MRI metingen het effect van ontstekingsremmende middelen na een hartinfarct kunnen detecteren
   De vier subdoelen dragen ieder bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De vier subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt en elk subdoel levert een bijdrage aan het hoofddoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.
   Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

   > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
   > De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek en toegepast gedaan naar Het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

> Het directe doel van het project is het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken

Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

   > De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten met deze 19F MRI nanodeeltjes methode na hartschade gescand kunnen worden in de MRI.
   > Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren enige stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.
   > Waarden voor mensen zijn dat door het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij de heling na een infarct, met name de ontstekingsreactie, van cruciaal belang is om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt

worden door specifieke wetgeving.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).*
   > De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.

   De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het voorgestelde ziektemodel en met metingen mbv de MRI bij kleine proefdieren. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven te kunnen uitvoeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen.
8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6)*.

   > De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Alle experimenten dragen bij aan de ontwikkeling van een nieuwe MRI methode om op een niet-invasieve manier ontstekingsprocessen in het hart na een hartinfarct te kwantificeren en meer inzicht te krijgen in hoe de ontstekingsrespons van invloed is op de hartfunctie op een later tijdstip Na optimalisatie en validatie van de nieuwe MRI techniek voor het kwantificeren van ontsteking in het hart is een keuzemoment voor de vervolgexperimenten. Alleen als de resultaten van Experiment 1 een goede correlatie laten zien tussen het gemeten ^{19}F MRI signaal en histologisch bepaalde hoeveelheid ontstekingscellen, worden deelexperimenten 2-4 uitgevoerd.
   De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

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

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

   ☐ Niet-menselijke primaten (10e)

   ☐ Dieren in/uit het wild (10f)

   ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)

   ☐ Zwerfdieren (10h)

   ☐ Hergebruik (1e, lid 2)

☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)

☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

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

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

> Er is voldaan aan bijlage III

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

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

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

> De “heelheid” van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermin-king of ontneming van soortspecifieke eigenschappen. Echter het ziektemodel (myocardinfarct tgv ischemie-reperfusie) induceert wel ongerief waardoor het natuurlijke gedrag van het dier kortstondig belemmerd kan worden. Zodra er afwijkingen te zien zijn aan het gedrag (=HEP) worden de dieren gedood.

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

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren (<15%) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per experiment, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
> De nanoparticles zijn eerst in vitro getest op celkweek. Hierbij is vastgesteld dat de nanodeeltjes worden opgenomen door ontstekingscellen en dat de functie en fenotype van de ontstekingscellen niet worden beïnvloed door de nanodeeltjes. In ons onderzoek willen we laten zien dat we de ontstekingsrespons na een myocardinfarct longitudinaal kunnen volgen en kwantificeren met niet-invasieve MRI technieken. Dit kan alleen gebruik makend van in vivo studies..

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

> Voor de experimenten (behalve optimalisatie en biodistributie in exp 1) wordt gebruikt gemaakt van de formule van Sachs die het benodigd aantal dieren berekend aan de hand van het verwachte effect (δ) en de verwachte spreiding (σ) tussen de dieren in dezelfde groep. Wij hanteren een significantie level van 0.05 en een power van 0.8, wat een F-waarde geeft van 15.7 Hierdoor wordt het aantal dieren gegeven bij gebruik van de formule van sachs gegeven door:

$n = 15{,}7 * (\sigma/\delta)^2$

In experiment 1 wordt het aantal dieren voor de optimalisatie en biodistributie geschat op 30. Een power analyse is hier niet mogelijk

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

> Alle handelingen met dieren worden uitgevoerd door ervaren biotechnici om zo het ongerief van het dier per handeling zo laag mogelijk te houden. De handelingen beschreven in dit project staan beschreven in de literatuur en geven betrouwbare data. MRI is de gouden standaard-methode voor de evaluatie van hartfunctie in diermodellen. Op dit moment hanteren de onderzoekers maximaal 2.5 uur (vanaf narcose inductie) om alle benodigde informatie met voldoende kwaliteit te kunnen meten. Om uitdroging tijdens de MRI sessie te voorkomen wordt subcutaan vocht toegediend. Ook wordt oogzalf aangebracht om uitdroging van de ogen te voorkomen.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.

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

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

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

> n.v.t.

NTS

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

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken het geringe en matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op *het* ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan hartfalen ten gevolge van ontsteking in het hart na een hartinfarct.

De 558 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen licht (17.4%), en matig (82,6%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten , welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig maar wel duidelijk aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken bij de mens.

Hoewel een substantieel aantal muizen matig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC

erkent dat het gekozen model het meest geschikte model is om deze MRI techniek in te ontwikkelen. Het maatschappelijk belang is dat het kunnen meten van de processen die een rol spelen bij de heling van een hartinfarct, met name de ontstekingsreactie dat een gevolg is van het infarct, is van cruciaal belang om gerichte therapieën te ontwikkelen die verslechtering van de hartfunctie en hartfalen kunnen voorkomen. In dit project wordt een nieuwe MRI techniek ontwikkeld met veelbelovende translatie naar de kliniek, waarmee ontstekingsprocessen in het hart gevolgd kunnen worden over de tijd. Hoewel patiënten met een hartinfarct een duidelijke doelgroep zijn voor het inzetten van deze technologie, zullen ook patiënten met myocarditis of een harttransplantatie (waar ontsteking een belangrijke rol speelt) hier enorm veel baat bij hebben.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Voor de DEC weegt voor het ontwikkelen en evalueren van een nieuwe MRI techniek om met behulp van ^{19}F nanodeeltjes de ontstekingsrespons na een hartinfarct te meten en de voorspellende waarde hiervan op de hartfunctie te onderzoeken op tegen het lichte en matige ongerief van 553 muizen. De DEC vindt dat het ontwikkelen van de nieuwe techniek voor toepassing van de MRI bij het meten van ontstekingsprocessen in beschadigde harten maatschappelijke positieve gevolgen heeft omdat het een niet invasieve techniek is waarmee eerder dan met de huidige technieken, ontsteking kan worden gemeten en therapieën kunnen worden gegeven en het effect kan worden gevolgd om deze ontstekingsreactie tegen te gaan. Door deze ontstekingsreactie te remmen kan hartfalen worden voorkomen .

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek.

Om dit doel te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt wordt door het nabootsen van de ziekte. De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een hartinfarctmodel. Dit weegt mee in de afweging tussen het licht en matige ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk).

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

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

   X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

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

      ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

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

   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

      ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…

      ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Tijdens de beoordeling zijn geen knelpunten naar voren gekomen

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 — Type dierproef: HFrEF en HfpEF inductie muizen

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het directe doel van deze experimenten is om inzicht te verkrijgen in de dynamiek en precieze tijdslijn van verschillende processen die ontstaan in hartfalen met (HFrEF) en zonder verlaagde ejectiefractie (HFpEF). De primaire uitkomstparameters is het metabolisme en mitochondriële functie van het hart.

Een deel van dit onderzoek willen we uitvoeren met genetisch gemodificeerde muizen met het metabool syndroom en diabetes type 2 (db/db muis). Het is bekend dat deze muizen hyperglycemia, hyperinsulinemia en obesitas ontwikkelen, en ontstaat een HFpEF fenotype. Deze groep wordt vergeleken met een controlegroep ($db^{+/?}$) met een C57BL/6J achtergrond. De primaire uitkomstparameters zijn: contractiele en mitochondriële functie van het hart.

Om een HFrEF fenotype te creëren, zullen twee type operaties gebruikt worden: het myocard infarct (MI) en het trans-aortische constrictie (TAC) model. Er zal een pilot gedaan worden om uit te zoeken welk model het meest geschikt is voor onze onderzoeksvraag. Op voorhand zou onze eerste keuze het myocard infarct (MI) model zijn, omdat hiermee meer ervaring is binnen het AMC. Dit is wereldwijd een veelgebruikt model om hartfalen te induceren.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De muizen zullen 2-3 maanden oud zijn op het moment dat de dierproef aanvangt. Afnames en toedieningsvolumina worden beschreven in het artikel van Diehl et al. (2001; J Appl Toxicol. 21(1):15-23).

Dag 1
Onder algehele anaesthesie en analgesie worden gedurende de operatie de dieren beademd zodat voorkomen kan worden dat de longen inklappen wanneer de thorax beschadigd raakt.

MI operatie:
De vierde linker tussenrib ruimte wordt geopend en met een hechtdraad wordt de linker coronair arterie afgekneld. De borstkas (spierlaag en huid) wordt vervolgens gesloten met hechtdraad. De vernieuwde en verbeterde techniek beschreven in Gao et al (Circ Res. 2010; 107(12): 1445–1453) zal worden toegepast.

TAC operatie:
De linker tussenrib ruimte wordt geopend en er wordt een gedeeltelijke vernauwing aangebracht ter hoogte van de aortaboog, met behulp van een injectienaaldje tussen de ligatuurknoop en de aorta. Bij verwijdering van de naald blijft vervolgens een lumen achter dat exact even groot is als de naald. De borstkas (spierlaag en huid) wordt vervolgens gesloten met hechtdraad.

Een deel van de controle groep zal eenzelfde type operatie ondergaan, maar zonder daadwerkelijke afknelling of vernauwing.

Dag 2 en 3
Op de eerstvolgende twee dagen na de operatie wordt analgetica toegediend.

Dag 3-7
Binnen een week na de operatie zal eenmalig een MRI uitgevoerd worden om de mate van infarctgrootte (MI) of constrictie (TAC) te bepalen. Dit om zekerheid te krijgen over het succes van de operatie en om aan te kunnen tonen dat de mate van constrictie vergelijkbaar is in de verschillende groepen. Voorafgaand aan de MRI metingen worden de muizen geanestheseerd. Tijdens de MRI scans wordt onderhoudsanesthesie toegepast. Verder wordt de lichaamstemperatuur wordt op 37°C gehouden en ademhaling en ECG gemonitord. Een klinisch MRI contrastmiddel kan worden toegediend via de staartvene ten behoeve van contrast-versterkte MRI metingen. De totale MRI tijd zal maximaal 2 uur bedragen. Uit voorgaande experimenten (die onder vergelijkbare condities in Eindhoven uitgevoerd zijn door AMC collega's) is gebleken dat de hartfunctie gedurende deze 2u niet achteruit gaat en dieren tot 3u in de MRI scanner gehouden kunnen worden. De MRI-apparatuur in het AMC zal medio 2017 operationeel zijn. Voor dit project zal een pilot uitgevoerd worden om dit protocol te optimaliseren en de tijdsduur zo kort mogelijk te houden.

Week 4-12
In de periode van 4-12 weken na de operatie verwachten wij dat de compensatoire hypertrofie duidelijk aanwezig is en hebben ook metabole adaptaties plaatsgevonden. Alle toegediende stoffen zullen daarom uiterlijk in week 4 voor het eerst toegediend worden. In deze periode zullen wij voor een periode van 2 weken het antibioticum doxycycline (deelstudie 2) of EMPA (deelstudie 4) aan het drinkwater toedienen. Eventueel worden in deelstudie 5 de compounds via een IP injectie aan de dieren toegediend. Direct voorafgaand hieraan zal de tweede MRI (zoals hierboven beschreven) plaatsvinden, en 2 weken later een derde, dit maal onder terminale anesthesie. Tijdens de 2 laatste verdovingen willen we naast MRI ook een ECG afnemen om het hartritme van het dier in kaart te brengen.

Na de laatste MRI zullen de dieren door middel van cervicale dyslocatie geëuthanaseerd worden, onder anesthesie. Direct daarna zal sectie plaatsvinden van hart en andere organen, voor verder functioneel, biochemisch en moleculair onderzoek.

Alle dieren zullen op gelijke tijdstippen, maar uiterlijk na 12 weken opgeofferd worden.

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

Het aantal benodigde muizen is gebaseerd op powerberekeningen (waar mogelijk) uit vorige experimenten.

Poweranalyses en overwegingen output variabelen
In alle studies zal het metabolisme en mitochondriële functie in kaart gebracht worden door de volgende metingen, met de benodigde dieren per groep voor een goede statistische vergelijking.

A. Hartfunctie, met behulp van state-of-the-art MRI voor kleine proefdieren (N=15)
B. geïsoleerde hartperfusie experimenten voor isotopen studies, ex vivo (N=30)
C. Mitochondriële respiratie, ex vivo (N=10)

D. Hartcel functie in geïsoleerde ventriculaire hartcellen, ex vivo (N=10)
E. Biochemische en moleculaire studies, ex vivo (N=10).

Onze primaire parameter is de mitochondriële respiratie. Om een verwacht verschil van 30% significant aan te tonen met een power van 80% en alpha=0.05, hebben we rond de 10 harten nodig per individuele meting per groep. De precieze groepsgrootte per deelexperiment volgt uit de SD uit de initiële experimenten en zal afgestemd worden met de IvD in het werkprotocol.

Sommige experimenten kunnen uitgevoerd worden op hetzelfde dier. Als voorbeeld: de functionele metingen in het intacte hart (MRI, *A*) kunnen uitgevoerd worden naast alle andere experimenten. Ook kunnen de mitochondriële respiratie metingen (*C*) gecombineerd worden met de biochemische en moleculaire studies (*E*). Daarnaast kunnen de studies met isotopen (*B*) en de hartcel functie (*D*) niet met andere ex-vivo experimenten samengaan. We streven ernaar zo veel mogelijk metingen te kunnen combineren. Als blijkt dat ook de hartcelfunctie metingen (*D*) te combineren te zijn, zal het aantal dieren per groep verminderen. We verwachten dat we daardoor 50 (*B*+*C*+*D*) dieren per groep nodig hebben om alle metingen uit te kunnen voeren.

De MRI unit in het AMC is per medio 2017 beschikbaar. Om onze proefopzet te optimaliseren met deze nieuwe apparatuur, willen we graag 20 extra muizen (10 controle en 10 db/db) aanvragen. Hiervoor willen we o.a. de test-hertest betrouwbaarheid testen, waardoor dieren maximaal 2 keer een MRI kunnen ondergaan.

De statistische methodes die toegepast worden op de resultaten zijn ANOVA, t-toetsen en indien noodzakelijk lineaire regressie analyse.
Onder kopje B staan de verdere overwegingen per diergroep en compound vermeld.

B. De dieren

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

Het project bestaat uit het onderzoeken van twee soorten hartfalen die veel voorkomen: hartfalen met normale (HFpEF) of verlaagde ejectie fractie (HFrEF). Hiertoe willen we muizen gebruiken, die commercieel verkrijgbaar zijn bij erkende fokkers. Voor alle studies zullen zowel vrouwtjes als mannetjes muizen gebruikt worden.

Overwegingen diergroepen
HFpEF fenotype
Dit onderzoek willen we uitvoeren met genetisch gemodificeerde muizen met het metabool syndroom en diabetes type 2 (db/db muis). Dit type muis heeft een niet-functionele leptine receptor, $Lepr^{db}$, waardoor het dier leptine-resistent is. Deze groep wordt vergeleken met een controlegroep ($db^{+/?}$) met een C57BL/6J achtergrond.

HFrEF fenotype
De dieren voor deze studies zijn genetisch hetzelfde als in de HFpEF groep ($db^{+/?}$), om statistische vergelijkingen tussen HFrEF en HFpEF mogelijk te maken. Om een HFrEF fenotype te creëren, zullen twee type operaties gebruikt worden: het myocard infarct (MI) en het trans-aortische constrictie (TAC) model. Voor deelstudie 3 (de chirurgische ingreep in de db/db muizen), die na het go/no-go-moment ligt wordt dezelfde operatie gedaan in db/db muizen.

Voor alle deelstudies maken we gebruik van de volgende 4 diergroepen:
1. Gezonde controle dieren (maximaal 370 dieren)
2. db/db muizen (HFpEF fenotype; maximaal 370 dieren)
3. Gezonde controle dieren met MI/TAC (HFrEF; maximaal 360 dieren)
4. db/db muizen met MI/TAC (HFpEF + HFrEF; maximaal 350 dieren)

In tabel 1 staan de overzichten van benodigde dieren per groep en deelstudie uitgeschreven.

Ad 3+4: Bij de conventionele MI techniek is de verwachting dat ongeveer 30% van de dieren overlijdt als gevolg van de initiële MI operatie. Ondersteunend personeel (met voorkeur in vaste dienst) zal de MI

operatie uitvoeren. De operatie wordt geoptimaliseerd door de techniek beschreven in Gao et al (Circ Res. 2010; 107(12): 1445–1453) toe te passen. Hierdoor wordt de proceduretijd drastisch verminderd en is de verwachtte initiële uitval ongeveer 10%. Daardoor zal het aantal benodigde dieren in deze groepen 10% hoger liggen. Vanwege de voorspelde winst in vermindering, zouden we graag 10 dieren willen aanvragen voor de aanleren en optimalisatie van deze nieuwe techniek.
Dieren die de operatie overleven zullen hartfalen met verlaagde ejectie fractie ontwikkelen in de 4-8 weken na de operatie. Collega's in het AMC (o.a. Profs Pinto, Strijkers & Drs Coolen, Coronel, Creemers, Zuurbier) en bevriende (buitenlandse) collega's maken gebruik van (één van) beide modellen om hartziekten te onderzoeken. Zij zijn betrokken bij deze aanvraag.

Overwegingen compounds
We maken gebruik van de volgende 5 compounds:

1. Antibiotica doxycycline (maximaal 200 dieren)
2. Controle antibiotica: amoxicilline (maximaal 200 dieren)
3. EMPA (maximaal 200 dieren)
4. Compound 1 (maximaal 200 dieren)
5. Compound 2 (maximaal 200 dieren)

Voor de compounds zijn een controle groep noodzakelijk voor statistische analyse.

Ad 2: Omdat antibiotica ook een effect heeft op de darmflora, en via deze weg een negatief effect kan hebben op de hartfunctie, is een extra groep dieren noodzakelijk die behandeld zijn met een ander antibiotica, namelijk amoxicilline. In deze groep kunnen we onderzoeken wat de effecten zijn van antibiotica die de darmflora aantasten, maar geen negatief effect hebben op de mitochondriële functie. Hierdoor is een extra controlegroep opgenomen voor deelstudie 2.

We verwachten maximaal 1450 dieren te gebruiken voor deze studie. Hierbij wordt rekening gehouden met:

1. Dat alle deelstudies worden uitgevoerd;
2. Uitval van dieren door de operatie niet verlaagd wordt, en
3. Alle experimentele metingen uitgevoerd gaan worden.

Dit aantal zal in de praktijk minder zijn als niet alle deelstudies en metingen uitgevoerd gaan worden, en de uitval van dieren minder is dan verwacht.

In tabel 1 staan de overzichten van benodigde dieren per groep en deelstudie uitgeschreven.

Tabel 1. Overzicht dieraantallen van de verschillende deelstudies

	Healthy	HFpEF	HFrEF	HFrEF+ HFpEF	TOTAAL
Optimalisatie	20	20	10	0	**50**
Vehicle (deelstudie 1-5)	100	100	100	100	**400**
Vehicle Amoxicilline (deelstudie 2+3)	50	50	50	50	**200**
Doxycycline (deelstudie 2+3)	50	50	50	50	**200**
EMPA (deelstudie 4)	50	50	50	50	**200**
Compound 1 (deelstudie 5)	50	50	50	50	**200**
Compound 2 (deelstudie 5)	50	50	50	50	**200**
TOTAAL	**370**	**370**	**360**	**350**	**1450**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging We hebben recentelijk onderzocht of antibiotica en EMPA de hartfunctie kan verslechteren en verbeteren op enkel cel-niveau. Dit was het geval en leidde tot deze aanvraag. Voor het vaststellen of deze cellulaire aanpassingen daadwerkelijk ook de hele hartfunctie verandert, is (nog) geen proefdiervrije methode beschikbaar. In cellijnen kan niet onderzocht worden hoe een metabool defect de hartfunctie verslechtert en op welke manier dit ontstaat. Humaan autopsie materiaal van het hart kan een indruk geven over de veranderingen in het hart metabolisme, maar deze studies zijn alleen uitgevoerd met hartweefsel in laatste fase van hartfalen, waarin veel mechanismes aangepast zijn. Zo kan er zonder dierproeven geen uitspraak gedaan worden over het precieze verloop van de metabole veranderingen in het hart. Voor de beantwoording van deze vraag is het dus niet mogelijk deze experimenten te vervangen door niet-dierproeven.

Vermindering Er wordt gestreefd naar een optimaal 'gebruik' van het proefdier middels het uitvoeren van verschillende analyses in één dier. Doordat MRI non-invasief is kan het gecombineerd worden met de terminale experimenten (druk volume metingen en celisolaties). Ook worden de eiwit en mRNA analyses uitgevoerd op de harten die gebruikt zijn voor ex vivo metingen van hartfunctie. De MRI geeft ons ook de mogelijkheid om op verschillende tijdspunten nauwkeurig de hartfunctie en het metabolisme in kaart te brengen. Dit vermindert ook het aantal benodigde dieren. De MI operatie wordt uitgevoerd door ervaren collega's binnen de lokale dierproefinstelling. Voor deze techniek zal niet de conventionele techniek toegepast worden, maar een nieuwe techniek (volgens Goa et al, 2010, Circ Res 107(12): 1445–1453). Het verwachte uitvalspercentage wordt hierdoor verlaagd van 30 naar 10%.

Verfijning Bij de uiteindelijke metingen is gekozen voor zeer nauwkeurige technieken (zoals MRI) en een minimum aan ongerief voor de muizen teweegbrengen (terminale anesthesie). Na optimalisatie van de zeer nauwkeurige MRI methode verwachten we geen grote technische problemen die het beantwoorden van de hoofdvraag in de weg zullen staan. De dieren zullen alleen onder terminale anesthesie gebracht worden als alle apparatuur voor de ex-vivo bepalingen tot onze beschikking is. De operatietechniek die toegepast wordt om de MI te induceren duurt korter (enkele minuten in plaats van 30 min). Hierdoor is er minder en minder lang anesthesie nodig.

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

De muizen worden dagelijks gecontroleerd door ervaren onderzoekers en/of biotechnici. Wanneer in de muizen voor het eerst een duidelijke gewichtsafname waarneembaar is, die niet past binnen de normale dagelijkse schommelingen zal de dierproef versneld afgerond worden. Andere humane eindpunten worden vermeld onder J.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Voor de operatie worden alle dieren subcutaan geïnjecteerd met het analgetica. Op de eerstvolgende twee dagen na de operaties wordt nog een bolus analgesie toegediend, beide volgens de algemene richtlijnen.
De echocardiografie en drukmetingen worden gedaan onder algehele anesthesie. Voor de terminale experimenten is geen postoperatieve analgesie nodig.
De dieren die tijdens de MI operatie onder anesthesie uitvallen (met de vernieuwde techniek ongeveer 10%), zullen hier geen ongerief van ondervinden. De overige dieren vertonen de eerste dag na de operatie ongerief van de operatie, waarna ze snel herstellen. Als de gestelde humane eindpunten bereikt worden, zal onder terminale anesthesie een MRI gemaakt worden waarna het dier opgeofferd worden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De antibiotica toediening in gezonde muizen zal niet leiden tot een welzijnsaantasting. Wel zullen dieren met HFpEF een licht ongerief hebben van de ontwikkeling van HFpEF (vooral door de obesitas en hyperglycemie). De HFrEF muizen zullen aan het eind van de dierproef matig ongerief ondervinden, door symptomen van hartfalen (zie J voor symptomen). De verwachting is dat de groep dieren die de experimentele therapie ondergaat, hier minder ongerief door zal ontwikkelen binnen het tijdsbestek van de dierproef.

Hieronder staat een overzicht van de handelingen en het verwachtte ongerief.

Soort ongerief	Kwalificatie

Anesthesie voor operatie (MI)	matig
Anesthesie voor MRI (3x)	matig
Doding onder anesthesie	terminaal
Ontwikkeling hartfalen HFrEF	matig
Ontwikkeling hartfalen HFpEF	licht
Ontwikkeling hartfalen HFrEF+HFpEF	matig
* (deels) na beslisboom	

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Verslechtering van hartfalen door de antibiotica behandeling kan leiden tot additioneel ongerief door cardiale dysfunctie.

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

Indien de dieren door de behandelingen een ernstige vorm van hartfalen vertonen of dieren met cyanose, dyspneu, lethargie of een slechte verzorging door andere oorzaken, die hoger is dan verwacht zullen wij de dierproef vroegtijdig termineren. De verdere humane eindpunten zijn genoemd onder J. De kans dat de dieren geen hypertrofie ontwikkelen binnen de gestelde termijn van 12 weken schatten wij op 10%, gebaseerd op eerdere experimenten. Hierbij is rekening gehouden met het geschatte aantal benodigde dieren.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De dieren worden beoordeeld en regelmatig (elke dag indien nodig) gewogen door ervaren onderzoekers / biotechnici. Ernstig lijden door het ontstaan van hartfalen wordt gesignaleerd door: het moment waarop, in de periode waarin hartfalen verwacht kan worden, voor het eerst een duidelijke gewichtsafname waarneembaar is, die niet past binnen de normale dagelijkse schommelingen. Dit komt neer op een duidelijke gewichtsafname op twee achtereenvolgende dagen (5 tot 10%) (ten opzichte van hoogste gemeten gewicht) of meer dan 8% binnen 1 dag.
Daarnaast zal door dagelijkse observatie ook gelet worden op andere klinische tekenen van hartfalen, zoals cyanose, dyspneu, lethargie en een slechte verzorging. Om het lijden van de dieren zoveel mogelijk te beperken, zal het dier opgeofferd worden.

We schatten in dat <5% van de db/db muizen die een operatie ondergaan en <1% van de overige muizen het humane eindpunt zal bereiken

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

We verwachten dat de db/db dieren (met HFpEF) die ook de HFrEF operatie ondergaan hier het meeste last van zullen krijgen. Dit studieonderdeel is om precies deze reden opgenomen na een beslisboom.

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 de verschillende behandelingen verwachten we verschillende mates van ongerief. Dit is weergegeven in de tabel onder *I*

Het cumulatieve ongerief voor alle dieren is matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Na doding van de muizen wordt het hart gebruikt voor functionele, biochemische en moleculaire analyses om het ziektemechanisme beter te doorgronden.

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

10.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef [redacted]
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171664
Bijlagen
1

Datum 12 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 2 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Kwantificatie van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI" met aanvraagnummer AVD1180020171664. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Kwantificatie van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 september 2017 tot en met 1 september 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 18 en 31 augustus 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Dit betrof het antwoord betreffende de aantasting van de integriteit van het dier, welk

antwoord een andere aanvraag betrof, en het aantal dieren.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Academisch Medisch Centrum
Adres: [redacted]
Postcode en plaats: [redacted]AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 september 2017 tot en met 1 september 2022, voor het project "Kwantificatie van de ontstekingsrespons na een hartinfarct met 19F MRI" met aanvraagnummer AVD1180020171664, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent (UD).
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 MRI in een muismodel van ischemie/reperfusie van het hart				
	Muizen (Mus musculus) / 436 C57BL/6 en 122 C57BL/6 ApoE-/-	558	83% Matig 17% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD1180020171664

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 dié 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.

1166

23 AUG. 2017

1.

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☑ Ja > *Vul uw deelnemernummer in*	11800
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	343362777	
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31
Postbus		
Postcode en plaats		
IBAN		
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC	

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

(Titel) Naam en voorletters		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*
- [x] Nee

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?

- [x] 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 - 10 - 2017
	Einddatum	30 - 9 - 2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	AMC
	Postadres	[redacted] Meibergdreef 31, 1105 AZ Amsterdam
	E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

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

☑ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035,00		Lege
☐ Wijziging €	Lege	
☐ Via een eenmalige incasso		
☑ Na ontvangst van de factuur		

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
☒ Projectvoorstel
☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing
☒ Melding Machtiging
☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	
Plaats	Amsterdam
Datum	21 - 8 - 2017
Handtekening	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum
1.3	Vul de titel van het project in.	Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren

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.

Hart- en vaatziekten (HVZ) zijn een van de belangrijkste doodsoorzaken in de Westerse wereld. Er wordt verwacht dat de incidentie van HVZ de komende jaren nog sterk zal toenemen door de steeds ouder wordende populatie en de toename van ziekten met een verhoogd risico op HVZ zoals obesitas en diabetes, het metabool syndroom. Myocardinfarct en beroertes veroorzaakt door de ontwikkeling van atherosclerose, in combinatie met een toename in het metabool syndroom zijn de belangrijkste vormen van hart- en vaatziekten.
Lipiden verlagende therapieën, vooral gericht op het LDL-cholesterol, vormen op dit moment de belangrijkste behandeling van hart- en vaatziekten en verlagen het risico met ongeveer 30%. Echter, in een groot deel van de patiënten zijn deze therapieën niet voldoende effectief. Hetzelfde geldt voor therapieën m.b.t. het metabool syndroom, zoals glucose verlagende middelen, waaronder insuline. Om de mortaliteit en morbiditeit als gevolg van HVZ en het metabool syndroom verder te kunnen verlagen is het dus belangrijk dat er nieuwe aanpakken worden ontwikkeld die HVZ kunnen verminderen naast de huidige bestaande therapieën.

Activatie van het immuunsysteem en de daaruit voortvloeiende inflammatie spelen een prominente rol bij de ontwikkeling van atherosclerose en HVZ, en het metabool syndroom (Libby, Tabas, Fredman, & Fisher, 2014, Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2012; Nurmohamed, Heslinga, & Kitas, 2015). Vanuit fundamenteel muisonderzoek is duidelijk dat interventies in het immuunsysteem en inflammatie kunnen leiden tot een verminderde atherosclerose ontwikkeling en het metabool syndroom ([redacted]). Een beter begrip van hoe activatie van het immuunsysteem en de resulterende inflammatie bijdraagt aan het ontstaan van HVZ en het metabool syndroom en de klinische complicaties van HVZ zal kunnen leiden tot een betere diagnose van patiënten en nieuwe innovatieve therapieën om HVZ te voorkomen en behandelen. Dit project richt zich op het verkrijgen van beter begrip in de rol van communicatie tussen immuun cellen [redacted] in het ontstaan van hart- en vaatziekten alsook het metabool syndroom in muizen zodat dit later tot nieuwe interventies kan leiden bij mensen.

Het immuunsysteem bestaat uit vele soorten immuun cellen. Tijdens homeostase, maar vooral tijdens een immuunrespons communiceren deze cellen met elkaar om een immunologische reactie (inflammatie en resolutie van inflammatie) in goede banen te leiden. [redacted] komen niet slechts tot expressie op immuuncellen, maar ook op o.a. endotheelcellen, gladde spiercellen, en adipocyten, hepatocyten.
Nadat receptor en ligand een interactie zijn aangegaan wordt via celtype specifieke signaaltransductie routes de afgifte van pro- of anti-inflammatoire chemokines en cytokines gestimuleerd(Gerdes & Zirlik, 2011). [redacted] spelen derhalve een centrale rol in weefsel homeostase, inflammatoire reacties en immuunregulatie. In de laatste 20 jaar is uit onderzoek gebleken dat de diverse [redacted] een belangrijke rol spelen in chronisch inflammatoire ziekten. Genetisch gemodificeerde muizen die een [redacted] missen die immuun cel activatie bevordert, zoals [redacted], hebben een verbetering van ziekteverschijnselen in chronisch inflammatoire ziekten (bv colitis, encephalitis, arthritis, atherosclerose) laten zien, terwijl muizen die een [redacted] missen die betrokken is bij het beperken van de immuunrespons, zoals [redacted], een verergering van het chronisch inflammatoire ziektebeeld laten zien.
[redacted] Gebruik makend van in vitro studies gecombineerd met in vivo muismodellen en patiënten materialen hebben we in de loop van de jaren belangrijke [redacted] opgehelderd die belangrijk zijn in de ontwikkeling van atherosclerose, atherosclerotische plaque stabiliteit, en in atherosclerose verwante aandoeningen zoals het metabool syndroom [redacted]

[redacted]

In het huidige project willen we verder gaan met de bestudering [redacted] daarmee atherosclerose en metabole dysregulatie beïnvloeden. Verder willen we nieuwe therapieën ontwikkelen die ingrijpen op [redacted] en daarmee atherosclerose en het metabool syndroom kunnen verminderen. Dit willen we doen door te bestuderen hoe interventies (bijvoorbeeld door genetische knockouts of met farmacologische blokkade) in deze processen het functioneren van [redacted] beïnvloeden en daarmee effecten hebben op obesitas/diabetes en atherosclerose. Daarnaast willen we mogelijke nieuwe, celtype specifieke signaaltransductieroutes, hun regulatie en de effecten op chemokine en cytokine uitscheiding van [redacted] identificeren en karakteriseren met deze studies, zodat we op basis daarvan nieuwe inhibitoren kunnen ontwikkelen en testen in modellen van atherosclerose en het metabool syndroom.

Referenties:

Chatzigeorgiou, A., Chung, K.-J., Garcia-Martin, R., Alexaki, V.-I., Klotzsche-von Ameln, A., Phieler, J., et al. (2014a). Dual role of B7 costimulation in obesity-related nonalcoholic steatohepatitis and metabolic dysregulation. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *60*(4), 1196–1210. http://doi.org/10.1002/hep.27233

[redacted]. *Immunology*, *9*(4), 271–285. http://doi.org/10.1038/nri2526

Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Pennells, L., Wood, A. M., White, I. R., et al. (2012). C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *The New England Journal of Medicine*, *367*(14), 1310–1320. http://doi.org/10.1056/NEJMoa1107477

Gerdes, N., & Zirlik, A. (2011). Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation - tipping the balance in atherosclerosis? *Thrombosis and Haemostasis*, *106*(5), 804–813. http://doi.org/10.1160/TH11-09-0605

[redacted] 1289-1

Libby, P., Tabas, I., Fredman, G., & Fisher, E. A. (2014). Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. *Circulation Research*, *114*(12), 1867–1879. http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302699

[redacted]

Nurmohamed, M. T., Heslinga, M., & Kitas, G. D. (2015). Cardiovascular comorbidity in rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, *11*(12), 693–704. http://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.112

[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?

Doelstelling:
Het hoofddoel van dit project is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol van [redacted] in hart- en vaatziekten, en het metabool syndroom. Het richt zich op fundamenteel onderzoek naar het functioneren van [redacted] in de verschillende cel types onder gezonde condities en onder condities die bijdragen aan ziekteontwikkeling. Daarnaast willen we met dit project op basis van het fundamentele onderzoek studies doen naar mogelijkheden van modulatie van [redacted] middels interventies in hun upstream en downstream mediatoren en signaaltransductiemoleculen en hierbij de effecten op ziekteontwikkeling in muismodellen onderzoeken.

We kunnen dit als volgt specificeren:

1. Via welke processen reguleren [redacted] activatie van de verschillende (immuun)celtypen onder inflammatoire condities?
2. Wat zijn de effecten van interventies (oa genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij hart- en vaatziekten en het metabool syndroom?
3. Wat zijn de consequenties van deze interventies voor hart- en vaatziekteontwikkeling en de ontwikkeling van het metabool syndroom?

Haalbaarheid:
[redacted] Hierdoor heeft de groep zeer goede expertise in huis om alle voorgestelde analyses uit te kunnen voeren. [redacted].
We schatten in dat de voorgestelde proeven haalbaar zijn omdat dit past bij een groepsgrootte van ongeveer 15 verschillende onderzoekers (AIO's, postdocs en analisten), en een groot aantal gastonderzoekers (10) die onder onze leiding diabetes/obesitas en atherosclerose proeven komen doen. We hebben de afgelopen jaren uitgebreide ervaring opgebouwd wat betreft de hoeveelheid proeven en dieren die door de onderzoekers gebruikt (kunnen) worden.
Hierdoor is dit project in zijn totaliteit zeer haalbaar.

3.3 Belang

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

Maatschappelijk belang: Nederland telt ruim 1 miljoen hart- en vaat patiënten en per dag overlijden 100 mensen aan de gevolgen van hart- en vaatziekten, worden 125 mensen getroffen door een beroerte en krijgen 80 mensen een hartinfarct (cijfers Nederlandse Hartstichting 2016). Met dit project willen we [redacted] ontrafelen die bijdragen aan het ontstaan van hart- en vaatziekten en het metabool syndroom. Hierdoor kunnen in de toekomst nieuwe therapieën ontwikkeld worden ter voorkoming en behandeling hiervan.
Wetenschappelijk belang: Wetenschappelijk gezien zal de kennis die we met dit project vergaren bijdragen aan een beter begrip van de moleculaire mechanismen die inflammatie beïnvloeden middels [redacted]. Ten eerste in relatie tot de ontwikkeling van hart- en vaatziekten en het metabool syndroom, maar de processen die we bestuderen en verder zullen gaan ophelderen zullen ook bijdragen aan een beter begrip van hoe macrofagen functioneren in vele andere (chronische) inflammatoire aandoeningen waarbij immuun checkpoint regulatoren een belangrijke rol spelen, zoals

IBD (inflammatoire darmziekten), MS (multiple sclerose), SLE (systemische lupus erythematosus), kanker etc.

De wetenschappelijke inhoud en het maatschappelijk belang van het onderzoek binnen onze onderzoeksgroep wordt beoordeeld middels 'peer-review' procedures en is in detail getoetst door internationale onderzoekers toonaangevend in het cardiovasculaire, immunologische en/of metabole onderzoeksveld. Al deze projecten worden op zowel wetenschappelijke kwaliteit als maatschappelijk belang zeer uitgebreid beoordeeld door de wetenschapscommissies van de betreffende instanties, zoals de Nederlandse Hartstichting, NWO en de European Research Council. Deze maken hiervoor gebruik van (inter)-nationale reviewers en maatschappelijke klankbordgroepen.
Verantwoording voor dit onderzoek wordt afgelegd naar o.a. de Nederlandse Hartstichting, de Europese Unie, maar ook naar de Raad van Bestuur van het AMC in de vorm van het garanderen van voldoende maatschappelijke-, gezondheids- en wetenschappelijke impact en het garanderen van het goed verlopen van promotie trajecten van promovendi.

3.4 Onderzoeksstrategie

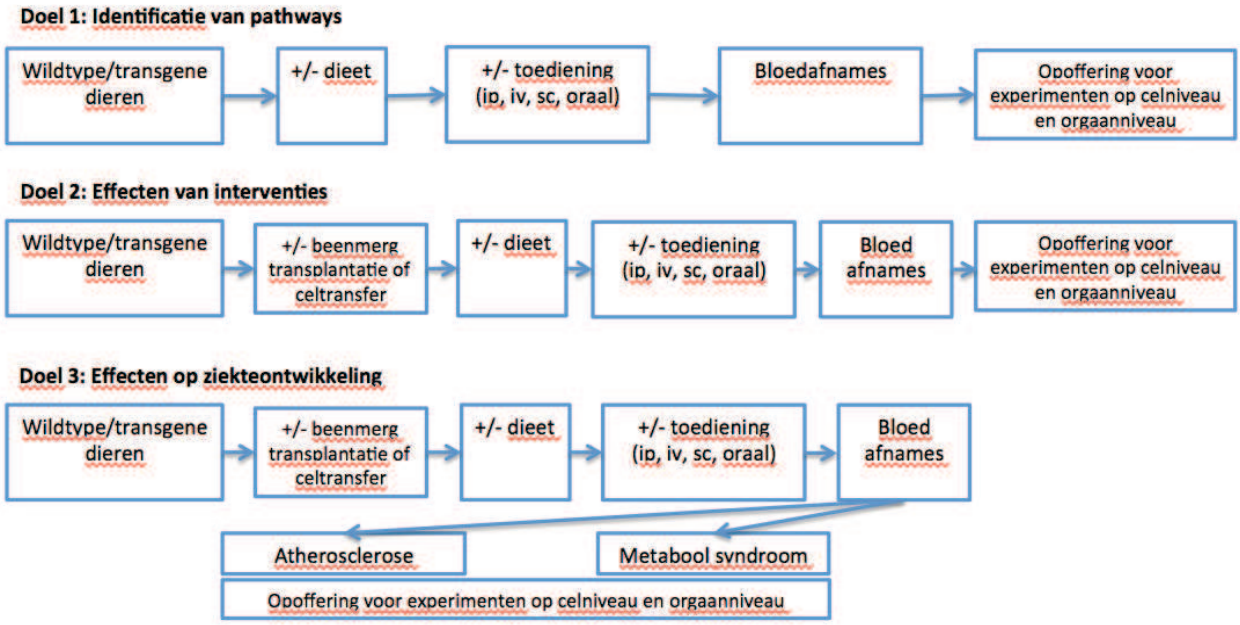
3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

Het onderzoek voorgesteld in dit project heeft als belangrijkste uitgangspunt voort te gaan met fundamentele kennis die eerder is opgedaan met humane, celbiologische en/of muisstudies. Een zeer belangrijk fundament ligt in dit "voorwerk". Dit "voorwerk" bestaat uit kennis die is opgedaan m.b.v. genetische studies in patiënten populaties kijkende naar genen die een rol spelen bij de ontwikkeling van hart- en vaatziekten maar ook andere chronische en acute inflammatoire aandoeningen waarbij een rol ligt voor [redacted]. Dit zullen gepubliceerde studies in de literatuur zijn en ongepubliceerde studies gedaan door collega's met wie wij samenwerken. Daarnaast zullen we als "voorwerk" kennis gebruiken die is opgedaan met celbiologische studies (muis en mens) en (genetische) screens van diverse immuuncellen, van atherosclerotische plaques en vetweefsel zoekende naar factoren die het landschap van [redacted] beïnvloeden. Opnieuw zullen we hierbij uitgaan van de literatuur maar ook sterk bouwen op onderzoek dat binnen de onderzoeksgroep en het onderzoeksinstituut loopt. Als laatste zal ook als "voorwerk" kennis gebruikt worden die is opgedaan met in vivo muis studies, eerder door ons gedaan of gepubliceerd. Voor zover mogelijk zal de humane relevantie van gevonden genen worden onderzocht in humane (immuun)cellen en humaan weefsel alvorens het werk in proefdieren zal worden gedaan.

Voortbouwend op onze al lang lopende onderzoekslijnen zal het onderzoek in dit project zich richten op drie hoofdonderwerpen, te weten:
A. [redacted] die (immuun) cel activatie en hart- en vaatziekten en/of het metabool syndroom beïnvloeden;
B. Genen die de functie van [redacted] aansturen en (immuun) cel activatie en hart- en vaatziekten en/of het metabool syndroom beïnvloeden en
C. Nieuw te ontwikkelen/te identificeren medicijnen die de functie van [redacted] en hart- en vaatziekten en/of het metabool syndroom beïnvloeden.

We willen voor al deze lijnen doelstelling 1, 2 en 3 doorlopen.

De experimentele workflow is aangegeven in onderstaand schema:



Kandidaat [redacted], kandidaat genen die hun functie beïnvloeden en medicijnen die hun werkwijze potentieel beïnvloeden passend binnen één van de drie hoofdonderwerpen zullen blootgesteld worden aan een trapsgewijze analyse die bepaald wordt door de reeds aanwezige kennis. Dit "voorwerk" bepaalt het niveau waarop de kandidaten instromen in onze analyses. Het vinden van nieuwe kandidaten zal gedaan worden door gebruik te maken van zowel in vitro als in vivo studies waarbij specifieke stimuli en omstandigheden worden gebruikt die relevant zijn voor ziekteontwikkeling (bijvoorbeeld door in vitro toediening van lipiden aan cellen of in vivo dieet-geïnduceerde hyperlipidemische omstandigheden in de muis).

Genen waarvan weinig bekend is zullen eerst uitgebreid in vitro gekarakteriseerd worden m.b.v. primaire celkweken (bv macrofagen, dendritische cellen, T-cellen, B-cellen, adipocyten, endotheelcellen, gladde spiercellen; vaak gecombineerd met studies met cellijnen en met humane cellen) en zullen getest worden op de expressie van meerdere [redacted] en voor functies die relevant zijn voor hart- en vaatziekten waaronder bijvoorbeeld cellulaire activatie en chemokine/cytokine afgifte, celadhesie, differentiatie, proliferatie, fagocytose en endocytose. Hierbij zal gebruik gemaakt worden van cellen uit transgene dieren (bv knock-out muizen) of cellen die in vitro behandeld worden met bv siRNA, shRNA of small molecules die aangrijpen op de kandidaatgenen.
Op basis van deze uitkomsten zal de beslissing genomen worden welke genen verder in vivo getest zullen worden, waarbij gekeken zal gaan worden naar o.a. weefselmacrofagen (bv peritoneaal macrofagen), T-cellen, B-cellen, dendritische cellen uit de milt en lymfeklieren, endotheelcellen en gladde spiercellen uit de vaatwand en adipocyten uit vetweefsel waarbij eerder genoemde functies geanalyseerd zullen worden, effecten op het functioneren van organen en effecten van modulatie van de kandidaatgenen op het immuunsysteem. Kandidaten waarvan vanuit het "voorwerk" al meer bekend is zullen eerder op dit in vivo niveau instromen.
Vervolgens zullen relevante kandidaten verder getest worden in in vivo ziektemodellen relevant voor hart- en vaatziekten en het metabool syndroom, te weten atherosclerose ontwikkeling en obesitas en diabetes ontwikkeling, als belangrijkste risicofactor voor hart- en vaatziekten. Opnieuw zullen hiervoor transgene muizen gebruikt worden, maar ook zal in bepaalde gevallen gekozen worden voor bijvoorbeeld een aanpak waarbij targetgenen gemoduleerd worden door siRNA, small molecules of antilichamen. Ook op dit niveau kunnen weer kandidaten instromen op basis van uitgebreidere kennis uit het "voorwerk".

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 onderzoek richt zich op de identificatie en karakterisatie van kandidaten die de functie van [redacted]

[redacted] moduleren en daarmee hart- en vaatziekten beïnvloeden.

In de eerste fase van de studies worden kandidaten geïdentificeerd door gebruik te maken van bestaande humane- en dier- cel modellen, eiwit-eiwit interactie studies, genexpressie studies in bestaande humane cohorten, genetische studies in families, en via genome-wide associatie studies (GWAS) in de humane populatie. Daarnaast zullen screens worden uitgevoerd op cellen en weefsels gebruik makende van onderstaand beschreven experimenten om additionele en nieuwe kandidaten te identificeren.

Afhankelijk van de expressie van de [redacted] en/of zijn respectievelijke modulator, zullen de in vitro studies gedaan worden in primaire cellen. De in vitro studies zullen o.a. gedaan worden met uit beenmerg gedifferentieerde macrofagen of dendritische cellen, T- of B-cellen en dendritische cellen geïsoleerd uit de milt en/of lymfeklieren, endotheelcellen of gladde spiercellen uit de vaatwand, adipocyten uit vetweefsel of macrofagen en B-cellen geïsoleerd uit het peritoneum. Deze cellen zijn afkomstig uit transgene muismodellen voor de betrokken genen of uit wildtype dieren waarbij ter bestudering van de genfunctie bijvoorbeeld gewerkt gaat worden met specifiek inhiberende of stimulerende small molecules of siRNAs. De cellen worden vervolgens gebruikt voor een zeer breed scala aan fenotyperingen waarbij een goed eerste beeld moet ontstaan van de rol van de betrokken kandidaat in het functioneren van de betreffende immuun checkpoint regulator en de gevolgen voor het fenotype van de (immuun)cel(len).

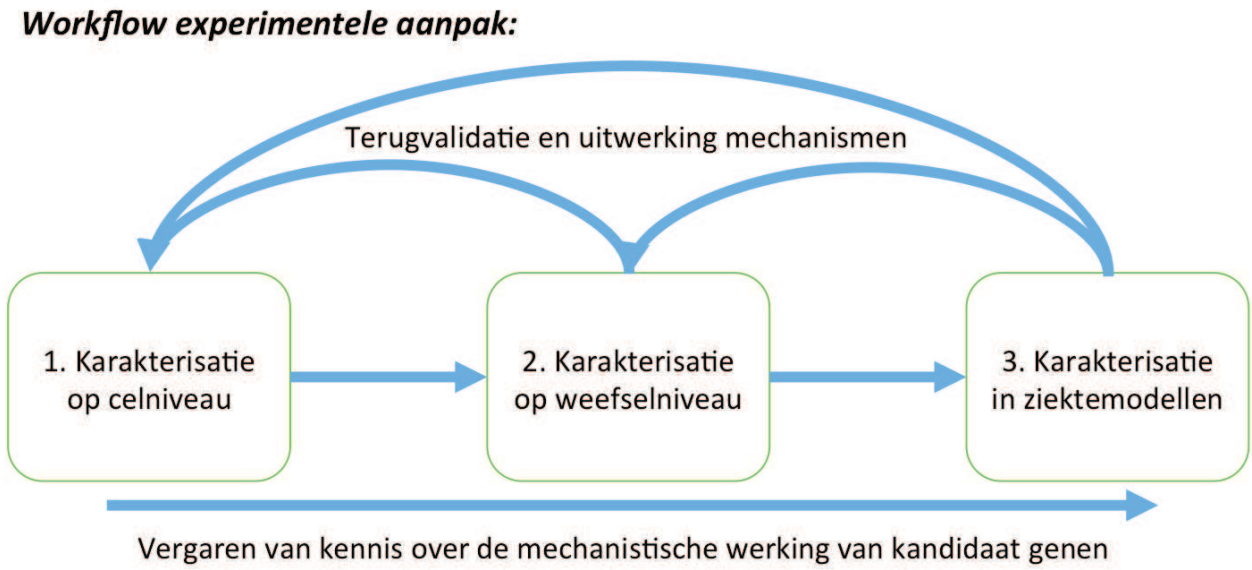
Vervolgens zullen studies gedaan worden waarbij gekeken gaat worden naar het functioneren van de desbetreffende (immuun)cel in vivo (bv cytokine productie, proliferatie, differentiatiestadium) en zullen deze cellen uit bloed of organen geïsoleerd worden. Dit zal gebeuren door eerdergenoemde muismodellen te gebruiken of interventies met inhiberende of activerende stoffen te doen. Hierbij zullen de relevantie (immuun)cellen geïsoleerd worden uit verschillende organen (bv peritoneum, milt).
De consequenties voor het functioneren van [redacted] in een ziekte setting en de gevolgen voor ziekteontwikkeling worden getest door gebruik te maken van in vivo muismodellen. De focus zal liggen op twee verschillende ziektebeelden, atherosclerose en het metabool syndroom waarbij de keuze voor welk ziektebeeld onderzocht zal worden bepaald wordt door het "voorwerk" en de eerdere studies zoals hierboven omschreven. In alle drie deze aanpakken zal de focus liggen op de relevante kandidaten door gebruik te maken van specifieke muismodellen die (mogelijk) transgeen zijn voor het betreffende kandidaatgen of door interventies te doen met verbindingen (bv. farmacologisch, antilichamen) die aangrijpen op het betreffende gen. Soms zal een studie gecombineerd worden met een beenmergtransplantatie waarbij specifiek naar de effecten van uit het beenmerg afkomstige immuuncellen gekeken kan gaan worden, of met de transfer van B- en/of T cellen van transgene muizen in muizen zonder eigen T en/of B cellen. Dit is een aanpak die een snellere maar vooral efficiëntere route is naar beter begrip van de functie van een gen in immuuncellen in de ontwikkeling van ziekte en het voorkomt complexe kruisingen waarbij veel muizen nodig zijn. Derhalve draagt dit dus bij aan een efficiënter proefdiergebruik. De onderstaande experimenten zullen in sommige omstandigheden uitgevoerd worden in een hyperlipidemische setting die gegenereerd wordt door muizen te gebruiken die door genetische veranderingen gevoelig zijn voor dieet-geïnduceerde hyperlipidemie (bv apoE of LDLR deficiënte dieren) of door een interventie (o.a. siRNA, virale transductie) die aangrijpt op het lipidenmetabolisme (bv LDLR, PCSK9) en daardoor ook gevoeligheid voor dieet geïnduceerde hyperlipidemie geeft.

a. Consequenties voor atherosclerose ontwikkeling. Deze proef is gericht op ontrafeling van het mechanisme dat ten grondslag ligt aan atherosclerose ontwikkeling in de vaatwand. Aandacht zal dan vooral uitgaan naar karakterisatie van immuun checkpoint regulatoren en (immuun)cel activatie in de atherosclerose ontwikkeling. Dit zal gecombineerd worden met uitgebreide karakterisaties van het immuunsysteem gedurende de atherosclerose ontwikkeling. Ook zullen biochemische bloedparameters gemeten worden gedurende de proef.
b. Consequenties voor metabole parameters. De experimenten binnen deze dierproef bestaan uit het geven van speciale diëten, gevolgd door een reeks aan metingen om inzicht te krijgen in de rol van immuun checkpoint regulatoren in het ontstaan van hyperlipidemie, diabetes en obesitas. Er zal o.a. gekeken worden naar obesitas ontwikkeling m.b.v. DEXA scans, en de mate van glucose tolerantie, en insuline resistentie als voorlopers van diabetes. Verder zullen de muizen metabool gekarakteriseerd worden in metabole kooien (respiratie, calorimetrie). Deze metingen kunnen op meerdere tijdspunten verricht worden om een indicatie te krijgen wat het effect van het kandidaat gen is op het verloop van de ziekte maar vereisen geen terminatie van het dier. Aan het eind van het experiment worden de dieren opgeofferd om m.b.v. uitgebreide analyses

van organen het ziektebeeld goed in kaart te brengen. Voor deze studies wordt nauw samengewerkt met experts in het veld uit het AMC en LUMC.

Voor een deel van de studies zal gewerkt gaan worden met muismodellen die ontstaan door nieuwe kruisingen van bestaande modellen. Hiervoor zal een inschatting van ongerief gedaan worden gedurende de eerste twee generaties.

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.



Figuur 1: Workflow van de experimentele aanpak met aangegeven de drie niveaus waarop karakterisaties zullen plaatsvinden.

Gedurende de in dit project beschreven experimenten zullen we kennis vergaren over de mechanistische werking van [redacted] in het functioneren van het immuunsysteem in ziekteontwikkeling (Figuur 1). Karakterisatie en identificatie van kandidaten zal op drie niveaus plaatsvinden: 1) op in vitro celniveau, 2) op in vivo cel- en weefselniveau en 3) op ziektemodelniveau. In het eerste geval zullen, afhankelijk van het expressiepatroon van de desbetreffende kandidaat (immuun)cellen in vitro gekarakteriseerd worden na behandeling met bv lipiden of cytokines waardoor zeer specifiek informatie over effecten en processen verkregen kan worden. In het tweede geval zullen cellen geïsoleerd worden uit verschillende organen en zullen de consequenties voor het in vivo functioneren van de desbetreffende (immuun) cel(len) in kaart worden gebracht, rekening houdend met de systemische en lokale (weefsel) context van de cellen. In het derde geval zullen de consequenties voor ziekteontwikkeling in relatie tot het functioneren van immuun checkpoint regulatoren in kaart worden gebracht.

Binnen de proeven is een duidelijke interactie qua experimenten omdat de processen en functies die op alle niveaus worden gemeten directe relaties met elkaar hebben. Effecten op een specifiek fenotype in de eerste analyses in vitro zal mogelijk consequenties hebben voor het functioneren van de cellen in vivo en dit zal vervolgens mogelijk effecten hebben op het functioneren in een ziekte-setting en op de ontwikkeling van die ziekte. Tussen de verschillende niveaus vindt ook interactie plaats. Bevindingen die gedaan worden op ziektemodel niveau kunnen bijvoorbeeld aanleiding geven tot experimenten op celniveau of orgaanniveau om onderliggende mechanismen op te helderen.

Afhankelijk van het voorwerk, zowel binnen de groep als in de literatuur, kunnen kandidaten op

verschillende niveaus het onderzoek instromen. Studies kunnen hebben aangetoond dat expressie van een kandidaat [redacted] effecten heeft op het in vitro functioneren van (immuun)cellen (met mogelijk beschreven consequenties voor bepaalde ziekten) en dit kan leiden tot een onmiddellijke toepassing van deze kennis op in vivo muismodel en/of ziektemodel niveau.

Mijlpalen:
- Succesvolle generatie en/of validatie van een model voor een kandidaat, bijvoorbeeld het verkrijgen van een muis die een kandidaat gen (celspecifiek) mist.
- Succesvolle karakterisatie van de effecten van interventie (bv door een knockout of behandeling met een farmacologische remmer) in een kandidaat gen op (immuun) cel functie in vitro
- Succesvolle karakterisatie van de effecten van interventie in een kandidaat gen op (immuun) cel functie in vivo
- Identificatie van de effecten van interventie in een kandidaat gen op ziekteontwikkeling (atherosclerose, metabool syndroom)

Keuzemomenten:
In onze experimentele aanpak maken we gebruik van een stapsgewijze procedure, als in een trechterformaat. In het kort: de kandidaten worden eerst basaal gekarakteriseerd met in vitro experimenten (niveau 1). Daarna vindt afhankelijk van de uitkomsten (effecten op voor hart- en vaatziekten relevante processen) een eerste selectie plaats (stoppen/doorgaan), wordt de keuze bepaald voor de richting van de vervolg-experimenten (die gericht zijn op in vivo (immuun) cel functie), en wordt de noodzaak voor verdere karakterisatie op orgaan/cel niveau bepaald (niveau 2). Een belangrijk keuzemoment ligt bij het ontbreken van een fenotype op celniveau en/of weefselniveau. Is dit het geval, dan betekent dit het einde van de experimenten met het diermodel. Als laatste fase worden kandidaatgenen getest in een of beide in vivo ziektemodellen (niveau 3). De keuze voor welk specifiek ziektemodel getest zal gaan worden, wordt bepaald door de uitkomsten op niveau 1 of 2 (of "voorwerk"). Bijvoorbeeld als een gen effecten heeft op de adipokine secretie in de adipocyt, is het aannemelijker om het in een obesitas model te testen, terwijl een gen dat effecten heeft op migratie van macrofagen/monocyten het mogelijk consequenties kan hebben voor zowel atherosclerose ontwikkeling als obesitas. De overgang tussen de verschillende niveaus wordt sterk bepaald door de daarvoor behaalde resultaten en mogelijk aanwezig "voorwerk". Zo kunnen bijvoorbeeld gepubliceerde studies van collega's die aantonen dat een [redacted] heel belangrijk is in cel activatie aanleiding zijn om direct naar niveau 3 te stappen en karakterisatie in ziektemodellen te gaan doen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Karakterisatie van immuun checkpoint regulatoren in relatie tot hart- en vaatziekten.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

3.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Karakterisatie van immuun checkpoint regulatoren in relatie tot hart- en vaatziekten

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Deze proef is gericht op het ophelderen van het mechanisme waarbij [redacted] ervoor zorgen dat immunologische reacties versterkt, danwel verzwakt worden ([redacted]). Daarnaast vindt validatie plaats van de effecten van nieuwe small molecules en antilichamen die de functie van [redacted] beïnvloeden.
Afhankelijk van de kandidaat die bestudeerd wordt zullen bv transgen, knock-in, knockout of conditionele (bv cel specifieke of induceerbare) muismodellen gebruikt worden. De rol van deze kandidaten wordt op drie niveaus in kaart gebracht:

1. Op celniveau. Hierbij worden gedetailleerde karakterisaties gedaan van uit muizen geïsoleerde cellen die al dan niet verder worden gekweekt in vitro. Hierbij wordt uitgebreid geanalyseerd hoe het functioneren van de relevante (immuun)cel wordt beïnvloed door activerende en ziekte gerelateerde stimuli en hoe interventies (door bv gebruik te maken van siRNA, small molecules of antilichamen) of knockouts/transgenen deze processen beïnvloeden. De cellen zullen geanalyseerd worden met o.a. FACS, Q-PCR, RNAseq, ELISAs, migratie- en adhesie assays, biochemische bepalingen, microscopie etc.
2. Op orgaanniveau. Hierbij wordt zowel het functioneren van de relevante (immuun)cel in organen gemeten als het functioneren van de organen zelf. Hierbij zal bv gekeken worden naar activatie statussen van (immuun)cellen onder activerende en ziekte gerelateerde condities en na interventies (door bv gebruik te maken van siRNA, small molecules, of antilichamen) of knockouts/transgenen. Ook zal gekeken worden naar systemische processen zoals bijvoorbeeld vetophoping, diabetes ontwikkeling, circulerende cytokine niveaus, en pathologische veranderingen in organen.

3. Op ziekte-niveau. Hierbij worden 2 ziektemodellen geïnduceerd, atherosclerose en het metabool syndroom, om de effecten van [redacted] en de ingrepen hierin op de ontwikkeling van deze hart- en vaatziekten te bepalen.

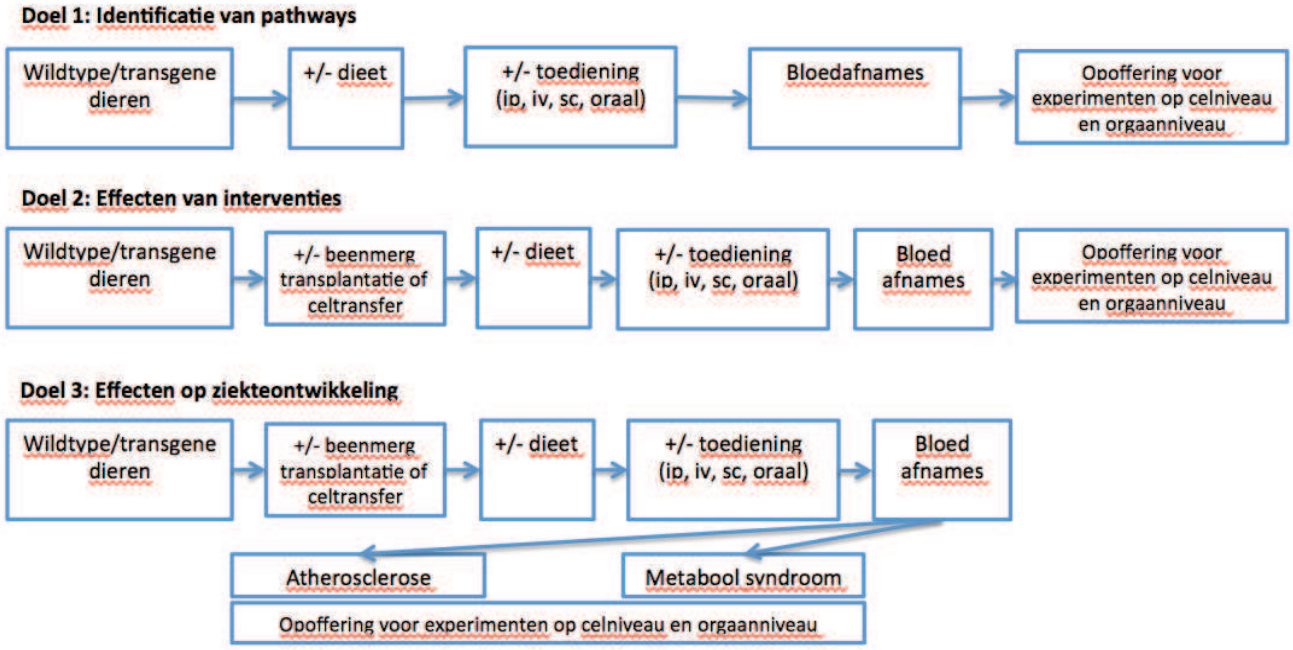
Alle experimenten op de hierboven beschreven niveaus staan in het teken van het ophelderen van de beschreven doelen, te weten:

1. Via welke processen reguleren [redacted] activatie van de verschillende (immuun)celtypen onder inflammatoire condities?

Wat zijn de effecten van interventies (o.a. genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij hart- en vaatziekten (inclusief het metabool syndroom)?

2. Wat zijn de consequenties van deze interventies voor hart- en vaatziekteontwikkeling inclusief het metabool syndroom?

De experimentele flow aansluitend bij deze doelen staat weergegeven in onderstaande figuur:



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.

Karakterisatie op cel-niveau:

1. *Ex vivo karakterisatie van immuuncellen, adipocyten en endotheelcellen en gladde spiercellen*
   Handelingen: -/+ dieet (max 6-12 wkn dieet) – +/- bloedafnames (max 5x)/vasten (max 2x 6uur)
   Aanpak: Beenmerg wordt geïsoleerd uit muizen om in vitro macrofagen en dendritische cellen te bestuderen mbv oa FACS analyses. Verder worden in dit beenmerg de hematopoietische en mesenchymale stamcellen gekarakteriseerd.
   Milt en lymfeklieren worden geïsoleerd uit muizen om in vitro dendritische cellen, T- en B-cellen te bestuderen mbv oa FACS analyses, proliferatie en differentiatie stimuli.
   Vetweefsel en/of aorta wordt geïsoleerd uit muizen om adipocyten danwel endotheelcellen en/of gladde spiercellen te bestuderen in kweek m.b.v. o.a. microscopy, FACS analyses en real time PCR. Dit wordt gedaan onder basale condities en onder dieet condities. Parallel wordt bloed afgenomen om systemische parameters (plasma cholesterol, cytokines) te kunnen meten. Al deze celtypen kunnen uit 1 muis worden geïsoleerd (reductie).
   Verwachting: 40 proeven per jaar (waarbij gevarieerd wordt met de targetgenen en het dieet). Hierbij worden 2 genotypes (wildtype en transgeen)/condities en 10 muizen per groep gebruikt = 800 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = 4000 muizen.

2. *Isolatie van beenmerg voor beenmergtransplantatie of T- en/of B-cellen voor cel transfer studies.*
   Handelingen: -/+ dieet (max 6 wkn dieet)
   Aanpak: beenmerg, milt en lymfeklieren worden geïsoleerd zoals beschreven onder 1. Per 5 acceptor dieren is 1 donordier nodig, en voor T en B cel transfers geld een maximum van 3 transfers per experiment (1 transfer per 2 wkn, cellen behouden 2 wkn hun functie).
   Verwachting: maximaal 20 proeven per jaar met 10-20 muizen per groep en 2 genotypes/condities, (20 x 20 x 2 = 800 dieren per jaar = 4000 dieren voor 5 jaar). Bij 5 acceptor-dieren gebruiken we 1 donordier. Er worden dus maximaal 2400 donoren (indien bij alle proeven een cel transfer zou worden uitgevoerd met maximaal 3 injecties). Deze proeven worden uitgevoerd zoals beschreven onder 'karakterisatie van weefselmacrofagen', 'karakterisatie of orgaan-niveau' en 'effecten op ziekteontwikkeling'.

3. *Karakterisatie van weefsel macrofagen*
   Handelingen: -/+ dieet – (max 12 wkn dieet) -/+ po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x/wk)/ injecties (max 8 wkn behandeling) – -/+ bloedafnames (max 5x)/vasten (max 2x 6uur) – -/+ BMT (1x)
   Aanpak: Weefsel macrofagen worden geïsoleerd uit muizen voor uitgebreide karakterisatie mbv assays als FACS, in vitro stimulaties, Q-PCR, RNAseq, ChIP-seq etc. Een focus zal liggen op geactiveerde peritoneaal macrofagen waarvoor thioglycolaat i.p. wordt toegediend. Dit zal afhankelijk van de specifieke vraag gecombineerd worden met injecties met macrofaag modulerende factoren zoals bv cytokines, small molecules (medicijnen), siRNAs. Andere weefselmacrofagen zullen geïsoleerd worden uit bv milt, bloed en lever. Parallel wordt bloed afgenomen om systemische parameters (plasma cholesterol, cytokines) te kunnen meten.
   Verwachting: 20 proeven per jaar (waarbij gevarieerd wordt met de targetgenen en het dieet). Hierbij worden 2 genotypes of interventies (bv wildtype, transgeen, siRNA, small molecule, cytokine) gebruikt en 10 muizen per groep = 400 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = 2000 muizen

Karakterisatie op orgaan-niveau:

1. *Karakterisatie van immuuncellen, adipocyten, endotheelcellen, gladde spiercellen en systemische parameters*
   Handelingen: -/+ dieet (max 30 wkn dieet)- -/+ po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x wk) injecties (maximaal 8 wkn behandeling)– -/+ bloedafnames (max 10)/vasten (max 2x 6h) - -/+ BMT (1x) of T of B- cell transfer (max 3 x).
   Aanpak: Weefsels worden in detail bestudeerd mbv oa. immunohistochemie en FACS. Parallel wordt bloed afgenomen om systemische parameters (plasma cholesterol, cytokines) te kunnen meten. Dit zal afhankelijk van de specifieke vraag gecombineerd worden met injecties met factoren die [redacted] moduleren bv cytokines, small molecules (medicijnen), siRNAs en antilichamen.
   Verwachting: 14 proeven per jaar (waarbij gevarieerd wordt met de targetgenen en het dieet). Hierbij worden 2 genotypes of interventies (bv wildtype, transgeen, siRNA, small molecule, antilichaam) gebruikt en 10 muizen per groep = 280 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = 1400 muizen

2. *Karakterisatie van metabole veranderingen*
   Handelingen: -/+ dieet (max 30 wkn dieet) - +/- po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x wk) injecties (maximaal 8 wkn behandeling)– -/+bloedafnames (max 10)/vasten (max 3x 6h) – -/+ BMT (1x) of T- of B-cel transfer – (max 5x) -/+ GTT/ITT – (max 3x) -/+ metabole kooi – (max 2x) -/+ Dexascan (max 2x)
   Aanpak: Bij muizen, al dan niet op dieet, worden metabole veranderingen gemeten door in bloed factoren als glucose, insuline, leptine en glucagon te meten. Dit zal afhankelijk van de specifieke vraag gecombineerd worden met injecties factoren die [redacted] moduleren zoals bv cytokines, small molecules (medicijnen), siRNAs en antilichamen. Verder zal glucose tolerantie en insuline resistentie gemeten worden als belangrijke risicofactor voor hart- en vaatziekten. Dit wordt gedaan door toediening van glucose of insuline (ip) en het verloop van de

glucosespiegels in de loop der tijd te volgen. Tevens zal een dexascan uitgevoerd worden waardoor veranderingen in vetmassa in kaart kunnen worden gebracht. Verder zullen muizen in metabole kooien geplaatst worden waarbij calorimetrie en beweging zullen worden gemeten.
Verwachting: 15 proeven per jaar (waarbij gevarieerd wordt met de targetgenen en het dieet). Hierbij worden 2 genotypes of interventies (bv wildtype, transgeen, siRNA, small molecule) gebruikt en 12-20 muizen per groep (afhankelijk van of er wel of geen metabole kooien worden gebruikt) = maximaal 600 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = 3000 muizen.

Effecten op ziekteontwikkeling:

1. *Atherosclerose studies*
   Handelingen: -/+ dieet (max 16 wkn dieet)– -/+ BMT (1x) of T of B cell transfer (max 4x)- +/- po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x wk) injecties (maximaal 8 wkn behandeling)– -/+ bloedafnames (max 3x)/vasten (max 2x 6uur).
   Aanpak: De dieren worden op een dieet gezet, eventueel voorafgegaan door een beenmergtransplantatie of T- of B- cel transfer (schatting: 10 proeven per jaar) en mogelijk gecombineerd met interventie injecties (p.o of i.p, i.v. of s.c.) met factoren die [redacted] of hun signaaltransductie moduleren zoals small molecules (medicijnen), cytokines, siRNAs en antilichamen. Gedurende het experiment vinden bloedafnames plaats voor biochemische en immunologische bepalingen. Aan het eind van het experiment worden de dieren getermineerd en vindt o.a. histologische analyse van het hart, de aorta en andere organen plaats.
   Verwachting: 30 proeven per jaar (waarbij gevarieerd wordt met de targetgenen en het dieet). Hierbij worden 2 genotypes of interventies (bv wildtype, transgeen, siRNA, small molecule) gebruikt en 20 muizen per groep = 1200 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = 6000 muizen. Daarnaast zijn er donordieren nodig (aantallen beschreven onder 'karakterisatie op celniveau' voor de beenmergtransplantaties en T- of B- cel transfers, uitgaande van het feit dat 1 donordier voldoende beenmerg of T- ob B-cel transfers oplevert voor ongeveer 5 acceptor dieren (al aangegeven onder paragraaf 'karakterisatie op celniveau'), en er maximaal 3 celtransfers (elke 2 weken) plaatsvinden voor B of T cel transfer.

2. *Obesitas en diabetes*
   Voor deze proeven is "Karakterisatie van metabole veranderingen" zoals beschreven onder "Karakterisatie op orgaan-niveau" het experiment. Hiervoor zijn dus geen aparte dieren nodig.

Handelingen

Bloedafname: Bloedmonsters worden genomen voor biochemische analyses (oa lipiden, cytokines) en immunologische analyses (oa FACS) met een max. van <10% van het circulerend volume per twee weken. Op bepaalde momenten wordt dit gedaan na vasten. De volgende richtlijn zal worden gevolgd: https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling (ongerief licht)
Oorknip: om dieren uit elkaar te houden zullen in bepaalde experimenten muizen geoorknipt worden om ze te kunnen identificeren. (ongerief licht)
Vasten: In een aantal gevallen is het noodzakelijk om de muizen kortdurend (max 6 uur, overdag, maximaal 3x met minimaal 2 wkn ertussen) te vasten om oa de lipiden levels te normaliseren (ongerief licht).
Dieet: Muizen worden gedurende 1 dag tot 30 weken met dieet gevoerd (hoog cholesterol dieet of hoog vet/diabetogeen dieet) of ter controle met gewoon dieet (Chow). Nat gemaakt hoog energetisch dieet wordt tijdelijk gegeven wanneer de dieren verzwakt zijn door een voorgaande handeling (bv BMT) (ongerief licht).
Orale (p.o) toediening: het oraal toedienen van geneesmiddelen dmv een canule in de maag. Frequentie hangt af van de proef, maximaal 3x per week gedurende 8 wkn. Volume: maximaal 500 ul (ongerief licht tot matig, afhankelijk van de frequentie en de duur).
Intraperitoneale (i.p.) toediening: Het intraperitoneaal toedienen van geneesmiddelen of liganden of cellen dmv een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maximaal 4x per week gedurende 8 weken. Volume: maximaal 500 ul. (ongerief licht tot matig, afhankelijk van frequentie en duur).
Intraveneuze (i.v.) toediening: Het intraveneus toedienen van geneesmiddelen of liganden of cellen dmv een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef, maximaal 3x per week gedurende 8 wkn). Volume:

maximaal 500 ul. (ongerief licht tot matig, afhankelijk van de duur).
Subcutane (s.c.) toediening: Het subcutaan toedienen van geneesmiddelen of liganden of cellen dmv een injectienaald. Frequentie hangt af van de proef (max 5x/wk gedurende 8 wkn). Volume: maximaal 500 ul. (ongerief licht tot matig, afhankelijk van de duur).
Intraperitoneale thioglycollaat injectie: Het intraperitoneaal toedienen van thioglycollaat dmv een injectienaald. Eenmalig. Volume: maximaal 1 ml. (ongerief matig)
Beenmerg isolatie: Om beenmerg te isoleren worden de dieren getermineerd en worden de botten geïsoleerd voor celisolatie en karakterisatie. (ongerief licht)
B of T cel isolatie: Om T of B cellen te isoleren worden de dieren getermineerd en worden de milt en lymfeklieren geïsoleerd voor celisolatie en karakterisatie. (ongerief licht)
Weefsel- en cel isolatie: Om weefsel en cellen te isoleren worden de dieren getermineerd en worden de weefsels en cellen geïsoleerd voor celisolatie en karakterisatie. (ongerief licht)
Insuline en Glucose tolerantie test (ITT en GTT): De dieren krijgen een injectie van insuline of glucose. Voor en gedurende 1.5–4 uur wordt regelmatig de bloedsuikerspiegel gemeten in een klein druppeltje bloed. (ongerief licht).
Metabole kooi: De dieren worden gedurende 1-14 dagen (afhankelijk van de proef) en 1-3x gedurende een proef in een metabole opstelling geplaatst waar beweging, zuurstofgebruik en kooldioxide productie in de lucht gemeten worden. Verder wordt voedselinname, urineproductie en faecus productie gemeten. (ongerief licht <24 uur en matig < 1 week).
DEXA scan: Om de vetdistributie te bekijken van de individuele dieren wordt het dier volledig verdoofd en gescand. Deze techniek kan op meerdere tijdstippen tijdens de dieet periode gebruikt worden. (ongerief matig).
Atherosclerose: Voor de inductie van atherosclerose worden de dieren op een normaal dieet of hoog cholesterol dieet gezet, gedurende maximaal 30 weken. Dit kan voorafgegaan worden door een beenmergtransplantatie of een T of B-cel transfer. Ook kan het gecombineerd worden met injecties (i.p, i.v. of s.c.) of een orale toediening met factoren die [redacted] of hun signaaltransductie-eiwitten moduleren zoals small molecules (medicijnen), cytokines, siRNAs en antilichamen. Frequentie hiervan hangt af van de proef. Gedurende het experiment zal bloedafname plaatsvinden volgens de regels opgesteld door nc3rs om biochemische en immunologische parameters te bepalen. Aan het eind van het experiment worden de dieren getermineerd en vindt o.a. histologische analyse van het hart en andere organen plaats. (cumulatief ongerief maximaal matig door beenmergtransplantatie en cel transfer of behandeling)
Beenmergtransplantatie (BMT): Bij een beenmergtransplantatie wordt het beenmerg van de dieren vervangen door het gewenste beenmerg (geïsoleerd uit donordieren) om zo de effecten van veranderingen in hematopoietische cellen te kunnen bestuderen. Voor de vervanging worden de acceptor dieren twee maal bestraald en vervolgens geïnjecteerd met donor beenmerg (geïsoleerd zoals beschreven bij beenmergisolatie) en een herstel van 6 weken. (ongerief matig voor de acceptor dieren; ongerief licht voor donordieren)
T of B-cel transfer: Bij een T- of B-cel transfer worden T-cellen of B-cellen uit de milt en/of lymfeklieren gehaald en wordt 1 x per 2 weken (zolang behouden de cellen hun activiteit), gedurende maximaal 8 weken elke 2 weken intraveneus ingespoten in muizen zonder T of B cellen om zo de effecten van veranderingen in T of B-cellen te kunnen bestuderen (ongerief matig voor de acceptor dieren; ongerief licht voor donordieren)

Termineren: Het doden van dieren wordt gedaan volgens de richtlijnen (ongerief licht).

Gebaseerd op bovenstaande figuur met de verschillende doelen betekent dit dat het cumulatief ongerief in geval van doelstelling 1 op matig zou kunnen uitkomen in geval de dieren bij de injecties een i.p injectie met thioglycollate krijgen. In geval van doelstelling 2, in het geval de dieren een beenmergtransplantatie en/of thioglycollate injectie krijgen is het cumulatieve ongerief eveneens matig. In geval van doelstelling 3 is het cumulatief matig indien er een atherosclerose proef met beenmergtransplantatie of T- of B-celtransfer wordt gedaan ontvangen.

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

Power berekeningen worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Ervaringen die binnen ons laboratorium en op basis van de literatuur zijn opgedaan (meer dan 15 jaar) worden meegenomen bij deze power berekeningen. Voor het uitvoeren van de powerberekening wordt

mede gebruik gemaakt van de richtlijnen beschreven in de artikelen van Lenth: http://conium.org/~maccoun/PP279_Lenth.pdf en Charan en Kantharia (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826013/) en van software voor groepsgrootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower).

B. De dieren

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

Diersoorten: Muizen zonder constitutioneel ongerief, zowel wildtype en genetische veranderde dieren. Als controles worden, daar waar mogelijk, wildtype nakomelingen gebruikt. Muizen hebben de voorkeur binnen dit project omdat de groep zeer uitgebreide ervaring heeft met muizen en dit goede en geaccepteerde modellen zijn voor de beschreven ziektes. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt. Bij de atherosclerose experimenten is een voorkeur voor vrouwen omdat de ervaring heeft geleerd dat deze iets sneller atherosclerose ontwikkelen, beter in grotere groepen te huisvesten zijn en iets minder spreiding laten zien. Echter, in sommige gevallen zullen ook mannelijke dieren gebruikt worden. Bij de obesitas en diabetes experimenten is een milde voorkeur voor het gebruik van mannelijke dieren omdat deze sterkere obesitas ontwikkelen en effecten van interventies beter meetbaar zijn.
Herkomst: Aankoop bij commerciële leveranciers of andere instellingen, via samenwerkingsverbanden, dan wel eigen fok.
Levensstadia: Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. In de meeste gevallen starten de experimenten als de dieren een leeftijd van 7-26 weken hebben.
Geschatte aantallen: De geschatte aantallen per proef zoals hierboven berekend zijn gebaseerd op statistische berekeningen, rekening houdend met uitval, gebaseerd op eigen ervaring of ervaring van naaste collega's, en rekening houdend met de hoeveelheden cellen/weefsel die nodig zijn voor de beschreven analyses. Het aantal proeven is gebaseerd op ervaring van de onderzoeksgroep, rekening houdend met de grootte van de onderzoeksgroep en verwachte aantallen experimenten die we willen en kunnen uitvoeren. Voor bovenstaande experimenten worden daarom de volgende maximaal hoeveelheden dieren aangevraagd:
1. Karakterisatie op cel-niveau: 8.400 dieren
2. Karakterisatie op orgaan-niveau: 4.400 dieren
3. Effect op ziekteontwikkeling: 6.000 dieren
Dit geeft een totaal van maximaal 18.800 dieren voor de periode van 5 jaar.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Functies van kandidaat-genen worden over het algemeen eerst in cellulaire modellen onderzocht om een indruk te kijken over het moleculaire mechanisme, hierdoor kunnen we betere keuzes maken in de modellen/meetmethoden en primaire uitkomsten. Dit kunnen cellijnen zijn maar ook primaire cellen (zoals hierboven beschreven), dit zorgt voor een verlaging van het aantal proefdieren dat gebruikt wordt. Parallel aan de studies met muismateriaal worden in de onderzoeksgroep ook studies gedaan met humane cellen om in een vroeg stadium een relatie van bevindingen en de humane situatie te kunnen leggen. Het bestuderen van ziekteontwikkeling zoals atherosclerose en obesitas /diabetes is zo complex dat een andere aanpak dan diermodellen niet mogelijk is.
Vermindering: Door zeer goede in vitro karakterisaties te doen met celmodellen (cellijnen, primaire muiscellen en humane cellen) wordt gedurende het hele traject van dit protocol goed gemonitord welke exacte in vivo analyses en modellen noodzakelijk zijn. Hierbij worden dus keuzes gemaakt voor specifieke

aanpakken gebaseerd op in vitro studies, en dit leidt tot specifiekere proeven en minder diergebruik. Er wordt ook deels gewerkt met beenmergtransplantatie studies waarbij door het transplanteren van beenmerg uit één enkele muis het immuunsysteem uit 5-6 muizen wordt gerepopuleerd. Dit leidt ook tot een sterke vermindering van het aantal dieren, ivm het aantal dat nodig zou zijn indien de juiste genotypes verkregen zouden moeten worden door kruisingen.
Verfijning: De groep heeft jarenlange ervaring met de verschillende methoden. Rond de transplantatie zullen de dieren behandeld worden met antibiotica (opgelost in het drinkwater) omdat gebleken is dat dit infecties na bestraling voorkomt en derhalve het ongerief vermindert. Ook zullen deze dieren indien nodig met hoog-energetisch week gemaakt voer gevoed 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.

Goede monitoring zal helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Beenmergtransplantatie: verminderde eetlust en gewichtsverlies
2. Toediening (p.o., s.c, i.p. of i.v) van interventie die immuun checkpoint regulatoren moduleren. De dieren worden hierbij regelmatig geïnjecteerd. De dieren kunnen hier stress van ondervinden.
3. Intraperitoneale thioglycollaat injectie: Thioglycollaat veroorzaakt een steriele ontsteking in de buikholte. De eerste dag kan de muis verminderd exploratief verdrag vertonen en verminderde vachtverzorging hebben.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Tijdelijke uitputting van het beenmerg en milde stralingsschade waardoor dieren darmschade krijgen
2. Irritatie door een milde ontsteking
3. Irritatie door een milde ontsteking

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

1. Gedurende maximaal 3 weken na BMT worden de dieren gevoerd met hoogenergetisch natgemaakt voer. Rond de transplantatie zullen de dieren behandeld worden met antibiotica (opgelost in het drinkwater) omdat gebleken is dat het beenmerg dan beter aanslaat.
2. Maximale doses worden goed bepaald op basis van beschikbare literatuur.
3. Er wordt maximaal 1 ml thioglycollaat ingespoten, de dieren worden goed gemonitord en er wordt op gelet dat de humane eindpunten niet worden overgeschreden.

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 het algemeen geldt: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. de ontwikkeling van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – openstaande vacht, abnormale houding, of gewichtsverlies >15% t.o.v. hoogst gemeten of >10% t.o.v. vorige weegpunt over een periode van 2-3 dagen zal overgegaan worden tot het euthanaseren van dat specifieke dier.

Specifiek onderdelen:
A. Beenmergtransplantatie: De ontwikkeling van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, gewichtsverlies (>15% na bestraling t.o.v. begingewicht, daarna >10% t.o.v. vorige weegpunt**,** niet meer dan 15% vanaf het hoogst gemeten gewicht) of afwezige voedselinname – over een periode van 2-3 dagen zal overgegaan worden tot het euthanaseren van dat specifieke dier.

B. Thioglycollaat injectie: Bij het bereiken van humane eindpunten (d.w.z. de ontwikkeling van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, of afwezige voedselinname – over een periode van 24 uur vlak na inspuiten) zal overgegaan worden tot het opofferen van dat specifieke dier.

C. Behandeling met immuun checkpoint regulator modulerende interventie: De ontwikkeling van verminderd exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, gewichtsverlies >15% t.o.v. hoogst gemeten of >10% t.o.v. vorige weegpunt – over een periode van 2-3 dagen wordt overgegaan worden tot het euthanaseren van dat

specifieke dier

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

Voor A : 10%; voor de rest van de muizen 2%.

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.

Cumulatief ongerief:
Karakterisatie op celniveau

1. Ex vivo karakterisatie van (immuun)cellen (n=4000).
   Cumulatief ongerief: 100% licht (doden zonder handeling, vasten, bloedafname, dieet)
2. Isolatie van cellen voor BMT of T- of B-cell transfer (n=2400).
   Cumulatief ongerief: 100% licht (doden zonder handeling, dieet).
3. Karakerisatie van weefselmacrofagen (n=2000).
   Cumulatief ongerief: 100% matig (-/+ dieet – (max 12 wkn dieet) -/+ po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x/wk)/ injecties (max 8 wkn behandeling) of -/+ BMT (1x) – -/+ bloedafnames (max 5x)/vasten (max 2x 6uur) –thioglycolaat injectie (eenmalig).

Karakterisatie op orgaanniveau

1. karakterisatie van (immuun)cellen (n=1400).
   Cumulatief ongerief: 70% licht (doden zonder voorafgaande handeling, vasten, bloedafname, dieet); 30% matig (+/- BMT *of* +/- therapeutische interventie o.g/s.c/iv (max 4x wk gedurende 6 wkn).
2. karakterisatie van metabole veranderingen (n=3000)
   Cumulatief ongerief: 100% matig (-/+ dieet (max 30 wkn dieet), +/- po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x wk) injecties (maximaal 8 wkn behandeling)– *of* – -/+ BMT (1x) of T- of B-cel transfer – -/+bloedafnames (max 10)/vasten (max 3x 6h) – (max 5x) -/+ GTT/ITT – (max 3x) -/+ metabole kooi – (max 2x) -/+ Dexascan (max 2x).

Effecten op ziekteontwikkeling

1. Atherosclerose studies (n=6000)
   Cumulatief ongerief: 60% licht (doden zonder voorafgaande handeling, vasten, bloedafname, dieet); 40% matig (-/+ dieet (max 16 wkn dieet)– -/+ BMT (1x) of T of B cell transfer (max 4x)- of +/- po (max 3x/wk) of ip (max 4x wk)/iv (max 3x wk)/sc (max 5x wk) injecties (maximaal 8 wkn behandeling)– -/+ bloedafnames (max 3x)/vasten (max 2x 6uur).
2. Metabool syndroom (diabetes/obesitas): zie karakterisatie op orgaanniveau, punt 2.

Concluderend:
Maximaal ongerief licht: 4000 + 2400 + 980 + 3600 = 10980
Maximaal ongerief matig: 2000 + 420 + 3000 + 2400 = 7820
Verhouding: 58% maximaal ongerief licht; 42% maximaal ongerief 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.

Er dienen cellen en/of organen geoogst te worden voor verdere 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

4.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer AVD1180020171666

1. Titel van het project
   Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren

2 Titel van de NTS
   Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren

2. Type aanvraag:
   - X nieuwe aanvraag projectvergunning
   - ☐ wijziging van vergunning met nummer

3. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC [redacted]
   - telefoonnummer contactpersoon [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon [redacted]

4. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken 15 juni 2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD

5. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie etc) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn

opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

6. Eventueel horen van aanvrager nvt
   - Datum
   - Plaats
   - Aantal aanwezige DEC-leden
   - Aanwezige (namens) aanvrager
   - Gestelde vraag / vragen
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

7. Correspondentie met de aanvrager nvt
   - Datum
   - Gestelde vraag/vragen
   - Datum antwoord
   - Verstrekt(e) antwoord(en)
   - De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt
   - Aard expertise
   - Deskundigheid expert
   - Datum verzoek
   - Strekking van het verzoek
   - Datum expert advies
   - Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
   Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
   >ja

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/ een wijziging op een bestaande vergunning~~.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
   >ja
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
   >nee

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft *(Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld).*

Deze aanvraag heeft een concrete hoofddoelstelling (het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol van [redacted] in hart- en vaatziekten, inclusief het

metabool syndroom) en kan getypeerd worden als een project met 3 subdoelen. De subdoelen zijn:
A) Via welke processen reguleren [redacted] activatie van de verschillende (immuun)celtypen onder inflammatoire condities?;
B) Wat zijn de effecten van interventies (o.a. genetisch, farmacologisch) in deze processen op specifieke (immuun)cel functies die belangrijk zijn bij hart- en vaatziekten?
C) Wat zijn de consequenties van deze interventies voor hart- en vaatziekteontwikkeling?
De subdoelen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Eerst zullen kandidaten geïdentificeerd worden die de functie van [redacted] moduleren en daarmee hart- en vaatziekten beïnvloeden. Vervolgens zullen interventies gericht tegen deze kandidaat onderzocht worden op de specifieke immuuncel functies die belangrijk zijn bij hart- en vaatziekten. Ten slotte zal in een ziektemodel onderzocht worden of de interventie ook een consequentie heeft voor de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project is zeer breed omschreven met een hoog abstractieniveau. Dit is in dit project gerechtvaardigd omdat het onderzoek uitgevoerd zal worden door 15 onderzoekers en een tiental gastonderzoekers. De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met deze onderzoekslijnen en gezien de omvang van de groep zal de hoofddoelstelling zeker behaald worden.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
   >nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van verschillende kandidaten op de [redacted] die een rol spelen in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. Er wordt ook translationeel onderzoek verricht doordat in de derde fase van de aanvraag het effect van een interventie gericht tegen deze kandidaat op het ontwikkelen van de ziekte wordt bestudeerd.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.
   Het directe doel (het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol van [redacted] in hart- en vaatziekten, inclusief het metabool syndroom) heeft een directe en reële relatie met uiteindelijke doel (het verbeteren van de behandelmethoden voor patiënten met hart- en vaatziekten). In deze aanvraag [redacted] kunnen beïnvloeden zal identificeren. Dit is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld omdat de belangrijkste behandeling van hart- en vaatziekten niet voldoende effectief is en er behoefte is aan een verbeterde behandeling. Daarnaast zijn er in de context van het onderzoeksveld en uit publicaties van de onderzoekers voldoende aanwijzingen dat immunologische processen een belangrijke rol spelen in deze ziekten.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol van [redacted] in hart- en vaatziekten, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten die aan hart- en vaatziekten lijden.
De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat de handelingen stress en mogelijk pijn zullen veroorzaken.
De kennis die verkregen wordt door dit onderzoek kan een bijdrage leveren aan betere behandelmethoden voor hart- en vaatziekten en het metabool syndroom.
De onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

   Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

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

   De IvD ziet er op toe dat alle personen die betrokken zijn bij dit onderzoek, zowel de onderzoekers als de analisten die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en hebben opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van kennis en deskundigheid.
   De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met deze onderzoekslijn en de verschillende modellen zoals voor atherosclerose en het metabool syndroom.

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

   Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de globaal beschreven uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. De doelstellingen in de aanvraag worden op verschillende niveaus onderzocht. Er wordt op cel-, orgaan- en op ziekteniveau onderzocht hoe [redacted] een effect hebben op de immuunrespons in hart- en vaatziekten. Tevens wordt het effect van een interventie gericht op deze kandidaten op zowel de immuunrespons als op het ziektebeeld onderzocht.

Welzijn dieren

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

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

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

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

    Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*.

    Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC meent dat deze inschatting juist is. Op zowel cel-, weefsel- als ziekteniveau zijn de verschillende protocollen die een individueel proefdier kan ondergaan omschreven. Tevens zijn alle verschillende handelingen geclassificeerd voor het ongerief dat ze veroorzaken. Het ongerief is ingeschat als licht tot matig.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).*

    De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Er is wel sprake van genetische manipulatie van betreffende kandidaat-genen. De doelstelling is echter dat dit het ziektebeeld zal verminderen.

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

    Het humane eindpunt is in het algemeen gedefinieerd als het verdwijnen van exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn (openstaande vacht, abnormale houding, of gewichtsverlies >15% t.o.v. hoogst gemeten of >10%

t.o.v. vorige weegpunt over een periode van 2-3 dagen).
Voor specifieke onderdelen is het humaan eindpunt nogmaals gedefinieerd maar komt overeen met de algemene definitie. Voor muizen met een beenmergtransplantatie zal 10% het human eindpunt bereiken en voor de overige dieren wordt verwacht dat 2% dit humane eindpunt zal bereiken. Dit lijkt vanuit de ervaring van de onderzoeksgroep een juiste inschatting.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
De aanvrager gebruikt vervangingsalternatieven waar mogelijk. De functie van kandidaatgenen worden over het algemeen eerst in cellijnen of in humane cellen onderzocht. Het bestuderen van de rol van het geselecteerde kandidaat-gen in de ziekteontwikkeling is echter te complex om in een vervangend alternatief te kunnen onderzoeken. Deze vraagstellingen kunnen alleen onderzocht worden in proefdieren.

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

Het aantal dieren is of zal per proef realistisch worden ingeschat op basis van statistische methoden en op basis van eerdere ervaringen en er is rekening gehouden met uitval. Het aantal muizen is ook ingeschat op de capaciteit van de onderzoeksgroep. Er is een duidelijke strategie beschreven met verschillende Go/No Go momenten. Dit borgt het weloverwogen gebruik van proefdieren.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*.
De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:
1) er is veel ervaring met deze modellen waardoor ongerief door onervaren handelen kan worden voorkomen;
2) rond de transplantatie zullen de dieren behandeld worden met antibiotica om bacteriële infecties te voorkomen. De dieren krijgen hoog-energetisch weekgemaakt voer tot hun beschikking;
3) Het humane eindpunt is daarnaast duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *(Zie Praktische handreiking*

ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).
Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt. Bij de atherosclerose experimenten is een voorkeur voor vrouwen omdat de ervaring heeft geleerd dat deze iets sneller atherosclerose ontwikkelen, beter in grotere groepen te huisvesten zijn en iets minder spreiding laten zien. Echter, in sommige gevallen zullen ook mannelijke dieren gebruikt worden. Bij de obesitas en diabetes experimenten is een lichte voorkeur voor het gebruik van mannelijke dieren omdat deze sterker obesitas ontwikkelen en de effecten van interventies beter meetbaar zijn. De aanvrager heeft dit voldoende wetenschappelijk omschreven.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).*

    De dieren worden gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood om de proefafhankelijke uitkomstparameters te kunnen analyseren.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.
    nvt

    NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).*
Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de rol die [redacted] *spelen in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, inclusief het metabool syndroom, het maximaal matige ongerief dat 18800 muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?*

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden).*

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het onderzoeken van de rol van [redacted] in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de patiënten die hart- en vaatziekten ontwikkelen. De meeste therapieën richten zich op het verlagen van bloedlipiden. Voor een groot gedeelte van de patiënten zijn de therapieën niet voldoende effectief. Er is daarom behoefte aan betere behandelmethoden.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat de handelingen stress en mogelijk pijn zullen veroorzaken.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en mogelijke patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op langere termijn een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van betere behandelmethoden voor hart- en vaatziekten en het metabool syndroom. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 18800 muizen maximaal matig ongerief ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Door de uitkomsten van deze studie kan de behandeling van hart- en vaatziekten mogelijk verbeterd worden. De toepassing van deze inzichten zal waarschijnlijk nog jaren duren en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de opbrengst van het onderzoek naar de rol van [redacted] in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten en het metabool syndroom, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het maximaal matige ongerief van maximaal 18800 muizen opweegt.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Opheldering van de rol van immuun checkpoint regulatoren in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol van [redacted] in de ontwikkeling van hart- en vaatziekten (inclusief het metabool syndroom), het gebruik van 18800 muizen en het lichte tot matige ongerief dat deze dieren zullen ondergaan, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In dit onderzoek zal de rol van [redacted] onderzocht worden, maar ook de mogelijke interventies om deze regulatoren te beïnvloeden. Dit

inzicht kan in de toekomst leiden tot nieuwe behandelmethoden voor hart- en vaatziekten. De muizen in dit onderzoek ondergaan maximaal matig ongerief door de verschillende handelingen. Er zijn duidelijke Go/No Go momenten die voorkomen dat er onnodig proefdieren gebruikt worden. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling: het verkrijgen van nieuwe behandelmethoden. De onderzoekers hebben of zullen proefdiervrije alternatieven gebruiken waar mogelijk, zoals voor het identificeren van de kandidaatgenen die betrokken zijn bij de regulatie door [redacted] en het uittesten van verschillende interventies (genetisch en farmacologisch). Om de rol van de [redacted] te kunnen bestuderen is een intact immuunsysteem nodig waarbij de interactie met het hart en vaten bestudeerd kan worden. De DEC ondersteunt de visie dat dit niet in een proefdiervrij alternatief onderzocht kan worden. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de groep veel ervaring heeft met de betreffende modellen waardoor ongerief door onervaren handelen voorkomen zal worden. De dieren die een beenmergtransplantatie ondergaan, zullen met antibiotica behandeld worden en weekgemaakt hoog-energetisch voer tot hun beschikking krijgen. Hierdoor treedt er eerder herstel van de beenmergtransplantatie op. De HEP is duidelijk omschreven en beschermt de dieren tegen het ontwikkelen van onverwacht ongerief.

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

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
     - ☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
     - ☐ Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
     - ☐ Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
   - ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
     - ☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
     - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
     - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

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

   Dit DEC advies is unaniem tot stand gekomen.

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

   Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld."

C5. Voorbeeld: "De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden."

C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: "Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt."

Voorbeeld B: "Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten...., een acceptabel alternatief is, omdat....."

C12. Voorbeeld: "De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen."

C18. Voorbeeld: "De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft."

Voorbeeld B: "Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan."

D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): "De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de

aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt."

E. Advies

E2. Voorbeeld: "Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn....."

Centrale Commissie Dierproeven

5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171666

Bijlagen
2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 augustus 2017. Het gaat om uw project "Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020171666. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project
Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur
Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

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

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171666

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171666

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11800
Naam instelling of organisatie:	Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	343362777
Straat en huisnummer:	Meibergdreef 31

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171666

Over uw project

Geplande startdatum:	1 oktober 2017
Geplande einddatum:	30 september 2022
Titel project:	Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren
Titel niet-technische samenvatting:	Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren
Naam DEC:	AMC
Postadres DEC:	[redacted], Meibergdreef 31, 1105 AZ Amsterdam
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	21 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171666

Bijlagen
2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 22 augustus 2017
Vervaldatum: 21 september 2017
Factuurnummer: [redacted]
Ordernummer: Kostenplaatsnummer [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1180020171666	€ 1035,00

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

6.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergdreef 31
AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1180020171666
Bijlagen
1

Datum 18 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 21 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren" met aanvraagnummer AVD1180020171666. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 15 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:
18 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171666

Bezwaar
Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.
Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[redacted]

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Rol van afweersysteem bij hart- en vaatziekten: immuun checkpoint regulatoren" met aanvraagnummer AVD1180020171666, volgens advies van Dierexperimentencommissie AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PI experimentele vasculaire biologie.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 juni 2017, ontvangen op 21 augustus 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Karakterisatie van [redacted] in relatie tot hart- en vaatziekten				
	Muizen (Mus musculus) /	18.800	42% Matig 58% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt

anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Aanvraagnummer:
AVD1180020171666

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.