AVD 10400 20171667

1 9 MEI 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?<br>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA. | [X] Ja > Vul uw deelnemernummer in | 10400 |
| | | [ ] Nee > U kunt geen aanvraag doen | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | Naam instelling of organisatie | |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [redacted] |
| | | KvK-nummer | 9215846 |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker. | Straat en huisnummer | Akkermaalsbos 12 |
| | | Postbus | 59 |
| | | Postcode en plaats | 6700AW Wageningen |
| | | Iban | NL10RABO0397066465 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Wageningen UR |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker | (Titel) naam en voorletters | [redacted] |
| | | Functie | onderzoeker |
| | | Afdeling | [redacted] |
| | | Telefoonnummer | [redacted] |
| | | Email adres | [redacted] |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.5 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) naam en voorletters | [redacted] |
| | | Functie | onderzoeker |
| | | Afdeling | [redacted] |
| | | Telefoonnummer | [redacted] |
| | | Email adres | [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 | |
| | | Email adres | |
| 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 | |
| | | [ ] Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn | |
| | | Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 | |
| 2.3 | Is dit een wijziging voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is? | [ ] Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier | |
| | | [ ] Nee > Ga verder met vraag 3 | |

| | | |
|---|---|---|
| 2.3 | Is dit een melding voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend? | [ ] Nee > Ga verder met vraag 3<br>[ ] Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 |

# 3 Over uw project

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | Startdatum | 1-5-2017 |
| | | einddatum | 1-5-2021 |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | | To determine the relation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | | Het bepalen van de relatie tussen eiwitfermentatie en darmgezondheid in varkens en pluimvee |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | Naam DEC | DEC Wageningen UR |
| | | Postadres | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| | | E-mailadres | dec@wur.nl |

# 4 Betaalgegevens

| | | | |
|---|---|---|---|
| 4.1 | Om welk type aanvraag gaat het? | [X] Nieuwe aanvraag Projectvergunning € | 2113 |
| | | [ ] Wijziging € | |
| 4.2 | Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD | [ ] Via een eenmalige incasso | |
| | | [X] Na ontvangst van de factuur | |

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

# 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
[x] Projectvoorstel + 7x appendix
[x] Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing
[ ] Melding Machtiging
[x] Bestelorder WUR 1059474

# 6 Ondertekening

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

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.

Centrale Commissie
Dierproeven Postbus 20401
2500 EK Den Haag

• dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
• dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
• dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

| | |
|---|---|
| Naam | [redacted] |
| Functie | [redacted] |
| Plaats | Wageningen |
| Datum | 10-5-2017 |
| Handtekening | [redacted] |

2.

**Form**
**Project proposal**

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

# 1 General information

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University |
| 1.3 | Provide the title of the project. | To determine the relation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry |

# 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 of routine production
[] Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
[] Research aimed at preserving the species subjected to procedures

[] Higher education or training
[] Forensic enquiries
[] Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

# 3 General description of the project

**3.1 Background**

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

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

**Background**

Gut health is an important aspect in pig and poultry production. It contributes to overall health and welfare, but is also affects productivity and resource efficiency. Gut health has been negatively related to high dietary protein concentrations. In humans, for instance, high protein intake (from red and processed meat) has been associated with an increased risk for developing colorectal cancer (Norat et al., 2005) and dietary protein intake has been associated with a (relapse in) inflammatory bowel disease (Andersen et al., 2012; Jowett et al., 2004). In young, growing livestock species like piglets and broilers, dietary proteins are essential to provide building blocks for growth. Hence, diets for young pigs and chickens traditionally contain high protein concentrations. In addition, the average use of antibiotics in pig and broiler production systems has been reduced by 5.0% and 7.4% in 2015 compared to 2014 (Autoriteit Diergeneesmiddelen, 2016), respectively, in order to minimize the risk of microbial resistance against antibiotics. At the same time, certain gastrointestinal issues (i.e. diarrhea) remain a large problem in pig and poultry production systems. Diarrhea often occurs in piglets in the post-weaning period (i.e. post-weaning diarrhea) and dietary protein has been implicated in post-weaning diarrhea (Heo et al., 2008, 2009, 2015). In broiler chickens, high dietary protein concentrations have been demonstrated to increase the moisture content of litter (Bench et al., 2016), increasing the incidence of wet litter syndrome. Wet litter can cause footpad dermatitis and subsequently can increase the incidence of hock burn and breast irritation in broilers (de Jong et al., 2014).

Protein fermentation in the hindgut is believed to be (partially) responsible for negative effects of dietary proteins on gut health. The ileal digestion of dietary protein differs between protein sources and levels (Heo et al., 2010; Salgado et al., 2002), which affects the flow of protein into the large intestine of pigs and poultry. In addition, endogenous secretions (such as mucus, enzymes and shed epithelial cells) contribute to the flow of proteins into the large intestine. In the hindgut, these proteins can be fermented by saccharo-proteolytic bacteria (such as Clostridia, *Proteus* and *E. coli*) resulting in the proliferation of these bacteria, some of which are known pathogens. In addition, proteins have a buffering capacity in the gut, which favors proliferation of pH-sensitive bacteria, which often include pathogens. Furthermore, the negative relation between protein fermentation and gut

health may be caused by protein fermentation metabolites, such as branched-chain fatty acids, ammonia, phenolic and indolic compounds, hydrogen sulfide, biogenic amines and nitric oxide and *N*-nitroso compounds. Some of these protein fermentation metabolites have potential damaging effects on gut function, but these conclusions mainly rely on tests in in vitro systems (Lin and Visek, 1991; Hughes et al., 2008; Andriamihaja et al., 2015 Beaumont et al., 2016; Leschelle et al., 2005). Such protein fermentation metabolites are produced in pigs and poultry as well, especially when feeding diets containing high protein content or a low digestible protein source (Bikker et al., 2006; Heo et al., 2010; Pieper et al., 2012, 2014; Qaisrani et al., 2014).
In the field of human nephrology, some of the organic acids produced during fermentation of proteins are well-known as uremic toxins (i.e. *p*-cresol sulfate and indoxyl sulfate), contributing to the so-called uremic syndrome, associated with malaise, poor appetite, intestinal complaints, wasting, tendency for malnutrition, sarcopenia and systemic low-grade inflammation in patients with advanced renal disease. Young piglets may be particularly susceptible to these toxic effects, because their immune system, gut and renal function – necessary for removal of these toxic organic acids – is still immature and impaired compared to the adult situation.

**Aim and objectives**
Despite numerous studies on the effects of high protein diet on gut health, we have a poor understanding which metabolites are responsible for the decreased gut health. A large consortium is established between research groups from 3 Dutch universities, [redacted]. In this consortium, we aim to increase our understanding of the interaction between feed utilization and animal health. We will use untargeted and targeted metabolite platforms, with which we can establish the difference in metabolites in different parts of the intestinal lumen, blood, intestine and liver tissue as influenced by ileal undigested protein. The key objectives of our consortium are:

1. To determine the changes in metabolites in feces, intestinal content, blood, liver and intestinal tissue, and correlate these changes to changes in microbial species and gut epithelium influenced by protein fermentation in pigs and poultry.
2. To elucidate the mechanisms by which metabolites cause compromised gut health (using intestinal organoids).
3. To validate whether (dietary) interventions aiming at removing harmful metabolites/microbial species in the gut will increase gut health pigs and poultry.

The novelty of this project is the application of untargeted metabolomics across samples and species and establishing the relation between (unknown) metabolites and gut health, thereby, aiming to elucidate the working mechanisms underlying the relation between protein fermentation and gut health.
It is of importance to perform this research with both pigs and poultry, because their digestive physiology differs substantially, likely resulting in differences between species in the relation between dietary protein, protein fermentation and gut health. Chickens have two stomachs, have many places where reflux of digesta occurs (i.e. between the two stomachs, from small intestine into the stomachs and from the cloaca into the colon and ceca) and the main site of fermentation are the ceca. Furthermore, the passage rate is higher in the small intestine of chickens, resulting in a lower enzymatic digestion. Therefore, the fraction of ileal undigested – but potentially fermentable – protein differs between species. Subsequently, passage of digesta into the ceca of chickens is selective (i.e. only the soluble digesta passes), whereas in pigs (and humans) the complete digesta will flow into the colon.

**Projects** [redacted]

Within the [redacted] program, 3 project proposals have been granted [redacted]. The first step in this consortium includes a series of 7 studies. These studies are combined in this application, because of the common project motivation, background and main objective. In addition, the leaders of these projects had a meeting with [redacted] with the objective to reduce overlap between studies. This has resulted in a reduction of the number of studies proposed and better use of experimental animals.

The 3 granted project proposals are entitled:

1) [redacted]

These 3 project proposals together contribute to the objective of determining the relation between dietary protein, protein fermentation (metabolites) and gut health in pigs and poultry and elucidating the underlying mechanisms, and are considered as sub-projects in the context of this CCD project application.

Below, the focus and design of each sub-project are described and these sub-projects will be conducted in parallel. However, there will be strong collaboration and cross-utilization of expertise and knowledge among the sub-projects within this consortium. The added value of combining these studies in this consortium is that obtained knowledge will be shared quickly between all partners. The designs of follow-up experiments will be adapted if required based on the newly obtained data.

Sub-project 1: [redacted]

When PWD occurs in practice, a reduction in dietary protein concentration is often advised and often helps to reduce PWD, indicating the involvement of dietary protein in PWD. Highly controlled experiments have been conducted to elucidate the effects of dietary proteins on different aspects of gut function and animal performance. These studies provide valuable information regarding the relation of dietary protein and animal performance. However, under experimental conditions, PWD does not always occur (Htoo et al., 2007; Nyachoti et al., 2006). It is, therefore, questionable whether these experimental (hygenic) conditions sufficiently represent the practical situation and what the contribution of protein fermentation is to PWD in practice. This sub-project is, therefore, aimed at developing knowledge regarding the relation between protein fermentation, gut function and PWD, contributing in the end to a reduction in PWD in piglets. Identifying metabolites responsible for negative effects on gut health and thereby establishing the working mechanisms underlying the relation between protein fermentation and PWD are fundamental aspects of this sub-project.

Sub-project 2: [redacted]

Poor enzymatic protein digestibility and overfeeding of protein results in the presence of undigested protein in the distal part of the small intestine as well as in the ceca and colon of broilers and pigs, respectively. In addition to these proteins not being available for utilization by the animal, this undigested protein also becomes substrate for proteolytic fermentation with a subsequent change in microbial composition, colonization of pathogenic bacteria and the production of metabolites and toxins. The first objective of this sub-project is to understand gut health better by evaluating the impact of ileal undigested protein on microbial activity, proteolytic fermentation, intestinal health and performance of piglets and broilers.
A second objective is to study transgenerational effects in poultry. A large body of evidence links maternal/fetal (mal)nutrition to the development of diseases after birth (in rodents and human; Godfrey et al., 2000, Hansen et al., 2014, Paul et al., 2016). In poultry, it is known that dietary protein fed to broiler breeders can affect broiler offspring performance (Rao et al., 2009). When low quality protein sources are fed to broiler breeders, an increase in ileal undigested protein can increase the production of (toxic) protein fermentation metabolites. To date, it is not known whether these metabolites are also transferred to the eggs and, subsequently, can affect broiler offspring gut health and performance. Therefore, this sub-project aims to determine transgenerational effects of protein fermentation metabolites in broilers.
This sub-project will provide knowledge regarding the development of protein fermentation, how this is affected when different protein sources (differing in amino acid composition) are fed and which (unknown) metabolites are related to the negative effects on gut health. In addition, metabolite profiles in broiler breeders, their eggs and offspring, have not been determined and associated before, and this could unravel potential mechanisms underlying transgenerational effects on gut health and performance.

Sub-project 3: [redacted]
Some of the organic acids produced during protein fermentation are well-known as uremic toxins (i.e. *p*-cresol sulfate and indoxyl sulfate) and might contribute to impaired gut health in piglets. In human pathology, renal transplantation provides an interesting model, because immunosuppressive drugs to prevent rejection of the transplanted kidney compromise immunological and intestinal functioning, while renal excretory function of toxic organic acids is impaired. These patients very often suffer from diarrhea, malnutrition and sarcopenia. In this sub-project, knowledge from observational cohort studies in renal transplant patients will be applied to gain insight into the relation between dietary protein, gut microbiota, protein fermentation and uremic toxin production in piglets and how this is affected by dietary interventions (i.e. vitamins, minerals and sulfate).

**Research categories**
The studies performed in this consortium will provide knowledge regarding the development of protein fermentation, how this is affected when different protein sources (differing in amino acid composition) are fed, and will elucidate the mechanisms by which protein fermentation negatively affects gut health. In addition, untargeted metabolomics will be applied to identify (up till now) unknown metabolites produced during protein fermentation and their relation with gut health will be determined. This research, therefore, can be considered as fundamental research.

The knowledge obtained in this consortium will contribute to a more efficient use of dietary protein and an improvement of gut function - especially during stressful periods such as the weaning period in piglets – and potentially to the reduction of therapeutic antibiotic use in pigs and poultry. Data from this project can be applied in feed formulation but can also be used to develop new products, and this research program, therefore, can be considered as translational research. The knowledge obtained with this project will be used to advice on changes in feed regimens for pigs and poultry to overcome compromised gut health.

References

Andersen V, Olsen A, Carbonnel F, Tjønneland A, Vogel U. Diet and risk of inflammatory bowel disease. Dig Liver Dis. 2012;44:185-94.

Andriamihaja M, Lan A, Beaumont M, Audebert M, Wong X, Yamada K, Yin Y, Tomé D, Carrasco-Pozo C, et al. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. Free Radic Biol Med. 2015;85:219-27.

Autoriteit Diergeneesmiddelen. 2016. Het gebruik van antibiotica bij landbouwhuisdieren in 2015. Trends, benchmarken bedrijven en dierenartsen, en aanpassing benchmarkwaardensystematiek.

Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, Khodorova N, Audebert M, Blouin J, Grauso M, Lancha L, Benetti P, et al. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. Free Radic Biol Med. 2016;93:155-64.

Bench C, Oryschak M, Korver DR, & Beltranena E (2016) Behaviour, growth performance, foot pad quality, bone density and carcass traits of broiler chickens reared with barrier perches and fed different dietary crude protein levels. Can J Anim Sci. 10.1139/CJAS-2015-0202.

Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huërou-Luron I, Lallés JP, Awati A. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. J Anim Sci. 2006;84:3337-45.

Godfrey, K. M., and D. J. P. Barker. 2000. Fetal nutrition and adult disease. Am. J. Clin. Nutr. 71:1344S-1352S.

Hansen, C. H. F., Ł. Krych, K. Buschard, S. B. Metzdorff, C. Nellemann, L. H. Hansen, D. S. Nielsen, H. Frøkiær, S. Skov, and A. K. Hansen. 2014. A maternal gluten-free diet reduces inflammation and diabetes incidence in the offspring of NOD mice. Diabetes 63:2821-2832.

Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. J Anim Sci. 2009;87:2833-2843.

Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ, Pluske JR. Feeding a diet with a decreased protein content reduces both nitrogen content in the gastrointestinal tract and post-weaning diarrhoea, but does not affect apparent nitrogen digestibility in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim Feed Sci Technol. 2010;160:148-59.

Heo, J., J. C. Kim, J. Yoo, and J. R. Pluske. A between-experiment analysis of relationships linking dietary protein intake and post-weaning diarrhea in weanling pigs under conditions of experimental infection with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim. Sci. J. 2015;86:286-293.

Htoo, J. K., B. A. Araiza, W. C. Sauer, M. Rademacher, Y. Zhang, M. Cervantes, and R. T. Zijlstra. 2007. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs. J. Anim. Sci. 85:3303-3312.
Hughes R, Kurth MJ, McGilligan V, McGlynn H, Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. Nutr Cancer. 2008;60:259-66.
de Jong IC, Gunnink H, van Harn J. Wet litter not only induces footpad dermatitis but also reduces overall welfare, technical performance, and carcass yield in broiler chickens. J Appl Poult Res. 2014;23:51-8.
Jowett, S. L., C. J. Seal, M. S. Pearce, E. Phillips, W. Gregory, J. R. Barton, and M. R. Welfare. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. Gut. 2014;53:1479–1484.
Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottière HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso M, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, et al. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. Biochim Biophys Acta. 2005;1725:201-12.
Lin HC, Visek WJ. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. J Nutr. 1991;121:887-93.
Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: The European prospective investigation into cancer and nutrition. J Natl Cancer Inst. 2005;97:906-1.
Nyachoti, C. M., F. O. Omogbenigun, M. Rademacher, and G. Blank. 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. J. Anim. Sci. 84:125-134.
Paul, H. A., M. Bomhof, . R., H. J. Vogel, and R. A. Reimer. 2016. Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. Sci. Rep. 6:20683.
Pieper R, Boudry C, Bindelle J, Vahjen W, Zentek J. Interaction between dietary protein content and the source of carbohydrates along the gastrointestinal tract of weaned piglets. Arch Anim Nutr. 2014;68:263-80.
Pieper R, Kröger S, Richter JF, Wang J, Martin L, Bindelle J, Htoo JK, von Smolinski D, Vahjen W, et al. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. J Nutr. 2012;142:661-7.
Qaisrani SN, Moquet PCA, van Krimpen MM, Kwakkel RP, Verstegen MWA, Hendriks WH. Protein source and dietary structure influence growth performance, gut morphology, and hindgut fermentation characteristics in broilers. Poultry Sci. 2014;93:3053-64.
Rao, K., J. Xie, X. Yang, L. Chen, R. Grossmann, and R. Zhao. 2009. Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. Br. J. Nutr. 102:848-857.
Salgado P, Freire JPB, Mourato M, Cabral F, Toullec R, Lallès JP. Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. Livest Prod Sci. 2002;74:191-202.

### 3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to determine the relation between dietary protein and microbiota, protein fermentation metabolites and their effect on gut health and performance of pigs and poultry.In this project we aim to reach this objective through a series of in vitro and in vivo pig and poultry studies. With our research strategy described in 3.4 we expect to reach our main project's objectives, because the scientific partners have extensive expertise in the research areas (i.e. animal nutrition, microbiology, host physiology/metabolism and metabolomics tools) required within this project. The industrial partner is a global leader in additives for animal feed, and a direct stakeholder for the utilization of newly gained knowledge.

**3.3 Relevance**

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

This project will provide insight in causal relations between protein fermentation, its end-products and gut health of pigs and poultry. This knowledge can be applied to develop nutritional solutions to prevent gut health problems and optimize gut function, which will contribute to an increase in overall animal health, thereby improving animal welfare.
In gut health problems such as post-weaning diarrhea in piglets, therapeutic antibiotics are applied due to the involvement of *E. coli* pathogens. The knowledge developed in this project will contribute to our understanding of post-weaning diarrhea and the relation with dietary protein. This knowledge can lead to nutritional solutions for post-weaning diarrhea, thereby contributing to a reduction in therepeutic antibiotic use.Increased understanding of the relations between protein fermentation (end-products) and gut health in pigs and poultry might also lead to hypotheses relevant for other species, including humans, where protein fermentation contributes to diarrhea in patients with renal disease.

**3.4 Research Strategy**

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

As mentioned in 3.1, this project is part of a [redacted] program, in which 3 project proposals, included as sub-projects in this CCD project application, have been granted [redacted]. We combine the first experiment(s) of each sub-project in this CCD project application.

Sub-project 1: [redacted]
This sub-project is aimed at developing knowledge regarding the relation between protein fermentation, gut function and PWD, contributing in the end to a reduction in PWD in piglets. The first experiment in this sub-project is a large-scale on-farm piglet study (see appendix 1 "On-farm piglet

experiment") to determine associations between PWD, protein fermentation metabolites and functional gut parameters. Based on the associations following this on-farm experiment, in vitro studies are performed to determine effects of identified metabolites and fecal water extracts (from piglets from the on-farm study) on gut function, using pig intestinal organoids. These organoids can be formed from isolated crypts of the intestine, and represent an almost complete functional derivate of the actual gut, and many relevant gut functions can be modelled in vitro in an unprecedented way. In the last phase of this sub-project, a second in vivo piglet experiment is anticipated to evaluate and validate the outcome of previous in vivo and in vitro experiments. However, this will be determined at a later stage in the project, and is, therefore, out of scope for this CCD project application.

Sub-project 2: [redacted]
The objective of this sub-project is to understand gut health better by evaluating the impact of ileal undigested protein on microbial activity, proteolytic fermentation, intestinal health and performance of piglets and broilers.
The first pig experiment (see appendix 2 "Digestibility experiment with piglets") in this sub-project aims to determine the effects of a health challenge and dietary digestible crude protein level on nutrient digestion, metabolite profile and animal performance. Low and high sanitary conditions are applied to generate a health disturbance similar as in practice, resulting in differences in sub-clinical health. Secondly, a pig experiment is performed to determine the (interactive) effects of dietary fermentable fiber and crude protein on extent of fermentation, fermentation end-products, microbial colonization, digesta passage rate, and feces quality (see appendix 3 "Digestibility experiment with cannulated pigs").
The first broiler experiment in this sub-project (see appendix 4 "Protein digestibility of different feed ingredients and the metabolic fingerprints of broilers fed these diets") aims to determine which (unknown) metabolites can be correlated to hind gut protein fermentation in broilers, as well as determine the potential of different protein sources to contribute to hind gut protein fermentation. Thereafter, an experiment is performed aimed at feed strategies to reduce protein fermentation and alter the metabolic fingerprint associated with protein fermentation in broilers and evaluate the effects of these feed strategies on gut health (see appendix 5 "Feed strategies to reduce protein fermentation and alter metabolic fingerprint associated with protein fermentation in broilers").
In the experiment described in appendix 6 ("Effects of dietary protein on metabolite profiles in serum and eggs of broiler breeders"), the aim is to determine transgenerational effects of dietary protein in poultry. Broiler breeders will be fed different diets to create a contrast in cecal protein fermentation and (serum) metabolite profiles will be determined. The transfer of metabolites to eggs and offspring will be measured, as well as effects on broiler offspring.
Follow-up experiments in this sub-project include in vitro broiler organoid studies to elucidate underlying mechanisms causing compromised gut health, based on the results and metabolites identified in the previous experiments. Subsequently, final experiments aimed at (dietary) interventions to increase gut health in pigs and poultry will depend on the outcome of these initial experiments and are, therefore, out of scope for this CCD project application.

Sub-project 3: [redacted]
In this sub-project, knowledge from observational cohort studies in renal transplant patients will be applied to gain insight into the relation between dietary protein, gut microbiota, protein fermentation and uremic toxin production in piglets and how this is affected by dietary interventions (i.e. vitamins, minerals).

A combination of in vitro and in vivo approaches will be used to gain insight into how different protein sources affect gut microbiota, large intestinal protein fermentation and uremic toxin production, and how this is affected by the supplementation of vitamins, minerals and sulfate. The experiment described in appendix 7 ("Uremic toxin production during the in vitro fermentation of proteins in ileal digesta") is aimed at the establishing predictive relations between the (amino acid) composition of ileal undigested proteins and the formation of uremic toxins during their subsequent fermentation in vitro.

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

This CCD project application contains 7 appendices.
In appendix 1, an on-farm piglet experiment is described, in which piglets with and without PWD are selected, killed and sampled from multiple commercial farms, to study the natural occurrence of diarrhea and the involvement of protein fermentation metabolites and microbiota.
In appendix 2, an in vivo digestibility experiment with piglets is described, with a 2x2 factorial design. Piglets are subjected to high or low sanitary conditions and a high or low dietary level of digestible crude protein and are sacrificed at 10 weeks of age for dissection to collect intestinal contents.
In appendix 3, an in vivo experiment with cannulated pigs in described, with a 3x2 factorial arrangement with dietary fermentable fiber content (feeding low fiber, feeding high fiber and feeding low fiber + infusing fiber in colon) and dietary protein (differing in structure) entering the colon as factors. Pigs are surgically fitted with a cannula in the distal ileum and a catheter in a blood vein. After recovery, dietary treatments are applied and digesta, urine and blood is collected. Feces is collected quantitatively from plastic bags which will be attached to the rear end of the pigs.

In appendix 4, an in vivo broiler experiment is described, with a 3x2 experimental design, including 3 different protein sources at 2 levels of ileal protein digestibility. Broilers are weighed at different time points, blood sampled and killed after 29 days and sampled to determine ileal crude protein and amino acid digestibility (using an indigestible marker), metabolite profiles (in serum and digesta samples) and read-outs of gut function.
In appendix 5, an in vivo broiler experiment is described, with a 2x2x2 experimental design, including factors diet structure, fiber level and protein source. Broilers are weighed at different time points, blood sampled and killed after 29 days and sampled to determine ileal crude protein and amino acid digestibility (using an indigestible marker), metabolite profiles (in serum and digesta samples), passage rate and read-outs of gut function.
In appendix 6, broiler breeders are fed diets differing in ileal protein digestion to create a contrast in cecal protein fermentation and blood is collected to determine serum metabolite profiles. Eggs are collected and sampled to determine transfer of (protein fermentation) metabolites to eggs. Eggs are incubated, hatched and broiler offspring killed to determine effects on offspring gut parameters. Broiler breeders are sacrificed to determine the effects of dietary treatments on gut parameters.In appendix 7, pigs, surgically fitted with cannulas in the terminal ileum are fed diets containing various protein sources expected to differ in amino acid composition of the undigested fraction. Ileal digesta of these pigs is harvested and used for a series of in vitro fermentation experiments to quantify the types and production rates of various uremic toxins.

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

See paragraph 3.4.1 for a description of the project, including the different appendices of each sub-project. This CCD application contains the first experiments (appendices) of each sub-project. The sub-projects are conducted in parallel and there will be strong collaboration and cross-utilization of expertise and knowledge among the sub-projects within this consortium. Within the project, experiments will be adapted if necessary based on the outcome of previous experiments (both within and between sub-projects).

Important selection points in this project include:

- Appendix 1: before the start of the experiment described in appendix 1, a pilot study will be conducted to determine/validate quick selection criteria for post-weaning diarrhea in piglets.
- Appendix 3: the selection of protein sources will depend on the data obtained in appendix 7.
- Appendix 4: dietary treatments in the experiment described in appendix 4 will be determined on in vitro digestion tests.
- Appendix 5: protein sources included in the diets described in appendix 5 will be selected based on the outcome of the experiment described in appendix 4 (both in vitro and in vivo experiment).
- Appendix 6: selection of dietary treatments for broiler breeders will be based on the outcome of the in vitro and in vivo experiment described in appendix 4.
- Appendix 7: selection of the protein sources to be included in the diets will be based on the in vitro work described in appendix 4.

A milestone in this project includes the (ileal) digestibility of a range of dietary protein sources/levels and their concomitant effect on gut health. In all sub-projects, (selected) samples of piglets and broilers will be used for metabolomics analyses. In this way, a library of metabolites will be accomplished for piglets and broilers. A milestone in this project will be the identification of metabolic fingerprints related to protein fermentation or impaired gut health in piglets and broilers.

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 | On-farm piglet experiment |
| 2 | Digestibility experiment with piglets |
| 3 | Digestibility experiment with cannulated pigs |
| 4 | Protein digestibility of different feed ingredients and the metabolic fingerprints of broilers fed these diets |
| 5 | Feed strategies to reduce protein fermentation and alter metabolic fingerprint associated with protein fermentation in broilers |
| 6 | Transgenerational effects of protein fermentation metabolites in poultry |
| 7 | Uremic toxin production during the in vitro fermentation of proteins in ileal digesta |

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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

# 1 Algemene gegevens

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Titel van het project | Het bepalen van de relatie tussen eiwitfermentatie en darmgezondheid in varkens en pluimvee |
| 1.2 | Looptijd van het project | 1-5-2017 - 1-5-2021 |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | Eiwit, fermentatie, darmgezondheid, varkens, pluimvee |

# 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 Projectbeschrijving

| | | |
|---|---|---|
| 3.1 | Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Eiwit is een belangrijke component in de voeding van varkens en pluimvee, omdat het de bouwstenen levert voor groei. Wanneer voereiwit niet volledig wordt verteerd in de dunne darm, komt dit in de dikke darm terecht, waar het eiwit door de micro-organismen (zoals bacteriën) wordt afgebroken. Hierbij komen stoffen vrij die mogelijk schadelijk zijn voor de darm. Het doel van dit project is de complexe relatie tussen voereiwit, micro-organismen en eiwitfermentatie en het effect daarvan op darmgezondheid in varkens en pluimvee in kaart te brengen. Hierbij ligt de nadruk op het meten van (tot nu toe onbekende) producten die gevormd worden tijdens eiwitfermentatie. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | In dit project zal kennis verkregen worden over de relatie tussen voereiwit, eiwitfermentatie (producten) en darmgezondheid in varkens en pluimvee. Deze kennis zal bijdragen aan een efficiënter gebruik van eiwit en het verbeteren van darmgezondheid in varkens en pluimvee, en kan daarmee bijdragen aan een vermindering in het gebruik van antibiotica.<br>Gezien de grote overeenkomst in fysiologie van varkens en mensen, zal de verkregen kennis in dit project mogelijk ook bij kunnen dragen aan het verbeteren van darmgezondheid in mensen. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | In dit project worden varkens en kippen gebruikt. Het aantal varkens is geschat op 3232 en het aantal kippen op 944. |

| | | |
|---|---|---|
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | In dit project zullen dieren voornamelijk voeders gevoerd krijgen die verschillen in eiwit (hoeveelheid en kwaliteit) en worden vervolgens monsters verzameld om de effecten hiervan te bepalen. Dieren zullen ongerief ondervinden als gevolg van hanteren (voor het wegen van dieren), het nemen van rectale mestmonsters en bloedmonsters. Daarnaast kan diarree ontstaan. Verder zullen dieren geëuthanaseerd worden voor het eenmalig verzamelen van darminhoud, darmwand en organen. In twee experimenten zullen 8 varkens geopereerd worden voor het plaatsen van een canule in de dunne darm om darminhoud te kunnen verzamelen, dan wel direct substraat in de darm te kunnen infuseren. In één van deze experimenten zal tijdens deze operatie ook een katheter in een bloedvat geplaatst worden om bloed te verzamelen. Deze operatie gebeurt onder narcose en daarna worden pijnstillers verstrekt en worden de varkens individueel gehuisvest. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Dit project bevat meerdere experimenten met varkens en pluimvee. Het ongerief in de pluimvee-experimenten is geschat op licht. Twee experimenten met varkens zijn geclassificeerd als licht. Twee experimenten met in totaal 16 varkens zijn geclassificeerd als matig. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Waar mogelijk zullen dieren de voedselketen ingaan. De overige dieren die worden geëuthanaseerd voor het verzamelen van monsters zullen naar de destructie gaan. |

# 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. | Waar mogelijk zullen eerst laboratoriummodellen gebruikt worden om de kwaliteit/verteerbaarheid van eiwitbronnen in te schatten.<br><br>In dit project zijn het varken en de kip de doeldieren. De interacties tussen voeding, micro-organismen en het dier zijn erg complex en kunnen niet bepaald worden met een proefdiervrij model. Ook voor het meten van (tot nu toe onbekende) producten van eiwitfermentatie en het bepalen van de gevolgen voor darmgezondheid is geen proefdiervrij model beschikbaar.<br>Wanneer (tot nu toe onbekende) producten van eiwitfermentatie geïdentificeerd worden in dierproeven zal het werkingsmechanisme van deze producten op darmfunctie getest worden op darm-organoids. Dit zijn modellen van darmweefsel die op het laboratorium gekweekt kunnen worden vanuit darmcellen. |
| 4.2 | **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Voor elk experiment is het minimale aantal dieren dat nodig is om een betrouwbaar antwoord te krijgen op de onderzoeksvraag bepaald met behulp van statistiek. Hiervoor is gebruik gemaakt van informatie uit de literatuur. |

| | | |
|---|---|---|
| 4.3 | **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | In dit project zijn het varken en de kip de doeldieren en er zijn geen alternatieve (dier)modellen beschikbaar om de complexe relatie en interacties tussen voeding, micro-organismen en het dier te bepalen. |
| 4.4 | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | • Tijdens de experimenten zullen de dieren dagelijks gecontroleerd worden door gecertificeerde en bekwame dierverzorgers.<br>• In geval van ziekte of ongerief anders dan voorzien is in het proefplan, zal een dierenarts worden geraadpleegd en na overleg bepaald worden of een dier moet worden behandeld of uit de proef gehaald moet worden.<br>• In de proeven waarin een canule geplaatst wordt in de darm van varkens zullen deze operaties uitgevoerd worden onder algehele narcose en pijnstilling toegediend worden na de operatie.<br>• Het hanteren van dieren, het verzamelen van bloed of mestmonsters en het euthanaseren van dieren wordt gedaan door bekwaam personeel om zo weinig mogelijk stress te veroorzaken.<br>• Varkens krijgen afleidingsmateriaal in de hokken en dit wordt regelmatig vervangen.<br>• Kippen krijgen bodembedekking (behalve wanneer mest + urine verzameld wordt gedurende 4 dagen) en zitstokken in de hokken.<br>• Dieren worden in groepen gehuisvest. Een uitzondering hierop zijn de varkens met een darmcanule (en bloedvatkatheter). Deze varkens worden individueel gehuisvest omdat de varkens anders elkaars canule/katheter kunnen beschadigen. Individueel gehuisveste varkens kunnen elkaar wel zien en horen en de varkens krijgen afleidingsmateriaal. |

# 5 In te vullen door de CCD

| | |
|---|---|
| Publicatie datum | |

| | |
|---|---|
| Beoordeling achteraf | |

4.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>1 | Type of animal procedure<br>On-farm piglet experiment |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The role of protein fermentation in the occurrence of post-weaning diarrhea (PWD) is poorly understood. The relation between dietary protein and PWD has been studied under highly controlled conditions, but then often diarrhea does not occur (Htoo et al., 2007; Nyachoti et al., 2006). It is, therefore, of importance to study PWD under practical conditions. The aim of this experiment is to determine associations between PWD, protein fermentation metabolites and gut function indices in piglets kept under commercial conditions.

**General design**

In this experiment, piglets will be selected and sampled from commercial farms. In collaboration with and advised by veterinarians, multiple farms will be selected. Farms will be classified based on known parameters (such as average daily gain, feed efficiency, mortality, known occurrence of outbreaks PWD). At each farm, piglets with and without PWD are selected and dissected for sample collection. In total, 200 piglets will be sampled, including healthy control piglets selected on each farm.

First, piglets are identified based on clinical signs of diarrhea (or non-diarrhea for the controls). Secondly, a rectal fecal sample is collected and scored on fecal consistency. The inclusion criteria (such as fecal pH, ammonia concentration) for piglets with PWD will be determined in a pilot study (see below, A – paragraph 3). Based on these developed criteria, piglets are classified as PWD and non-PWD (controls) and, lastly, are blood-sampled and killed for sample collection. Blood-sampling is performed before killing because the method of killing might affect the (protein fermentation) metabolite profile in the blood. Collected samples at dissection include digesta, urine and intestinal tissues.

Recently, Dou et al. (2017) showed that pre-weaning microbiota diversity and composition could be related to PWD under experimental conditions. In this experiment, fecal samples will, therefore, be collected at two additional time points before dissection, in which microbiota/pathogen analyses are conducted. This will enable the investigation of causal relations between microbial composition and/or pathogens and PWD.

Differences between farms in feed composition can occur, but are generally small in Dutch piglet farming. Feed-specific data will be recorded at each farm and will be part of the farm effect in the data analysis.

**Primary outcome parameters**

First, analyses will be conducted in samples from all 200 piglets to quantify protein fermentation, using known protein fermentation products (i.e. *p*-cresol). Based on these results, a sub-set will be selected to obtain a representative reflection of the variation in protein fermentation in PWD piglets. In this subset, detailed laboratory analyses will be performed. Detailed analyses include microbiota composition in digesta or fecal samples, presence of pathogens causing diarrheal disease, intestinal morphology, mucosal barrier function measures and blood inflammatory cytokines. In addition, (untargeted and targeted) metabolomics analyses will be performed in feces, digesta or blood samples. Finally, multivariate analyses are performed

to determine associations between protein fermentation, PWD, pathological/functional read-outs of gut function, microbiota parameters, metabolomics analyses and immunological measures.

**References**

Dou, S., P. Gadonna-Widehem, V. Rome, D. Hamoudi, L. Rhazi, L. Lakhal, T. Larcher, N. Bahi-Jaber, A. Pinon-Quintana, A. Guyonvarch, I. L. E. Huërou-Luron, and L. Abdennebi-Najar. 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. PLoS One 12:e0169851.

Htoo, J. K., B. A. Araiza, W. C. Sauer, M. Rademacher, Y. Zhang, M. Cervantes, and R. T. Zijlstra. 2007. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs. J. Anim. Sci. 85:3303-3312.

Nyachoti, C. M., F. O. Omogbenigun, M. Rademacher, and G. Blank. 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. J. Anim. Sci. 84:125-134.

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

In this experiment, we are studying PWD and the variation in protein fermentation under practical circumstances. Therefore, we will exclusively focus on natural occurrence of diarrhea and will not impose (dietary) treatments. The onset of PWD occurs around 3 to 4 days after weaning (advise of pig veterinarian; Kyriakis et al., 1999; Madec et al., 1998) and can remain up to 2 weeks after weaning (Kyriakis et al., 1999; Heo et al., 2008). Three to 14 days following weaning will be the window for PWD identification and subsequent dissection and sample collection at the commercial farms. Because early life microbial biomarkers could be of importance as well, fecal samples are collected in the pre-weaning period as well. In total, 3 fecal samples are collected per piglet (1 pre-weaning, 1 post-weaning and 1 for PWD identification/before dissection). It is unknown which piglets will develop diarrhea in the post-weaning period, therefore, a larger group of piglets will be sampled for feces in the pre-weaning and early post-weaning period (see also B - estimated numbers).

In this experiment, microbial composition and microbial metabolites in piglets are studied, and, therefore, individual piglets which have received antimicrobial treatments should not be included. When sows have been treated with antimicrobials, her piglets will not be included. In general, few group antimicrobial treatments are applied to piglets in the pre-weaning period. Pre-weaned piglets which have been treated individually will not be included in this study. In the post-weaning period, antimicrobial treatments (for PWD) should be withheld in the period of sample collection in the departments from which piglets will be selected. In case of diseased piglets (other than diarrhea), there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. For instance, if individual piglets should be treated for joint infections, these piglets will not be included in the experiment. Selection of piglets will be based on clinical signs of PWD and a rectal fecal sample is obtained to verify diarrhea or non-diarrhea. A maximum of 3 attempts is used per piglet per day in order to obtain a rectal fecal sample from a piglet (via manual stimulation).
Based on the fecal samples collected post-weaning, piglets will be selected, blood-sampled and killed (within 36h after fecal sampling), and, subsequently, the gastrointestinal tract will be removed and tissues and intestinal digesta collected.

Laboratory analyses as described in the previous paragraph will be conducted in the obtained samples and the data following statistical analyses will result in important associations between protein fermentation, PWD, pathological/functional read-outs of gut function, microbiota parameters, metabolomics analyses and immunological measures.

References

Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2008. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. Arch. Anim. Nutr. 62:343-358.
Kyriakis, S. C., V. K. Tsiloyiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A. C. Tsinas, C. Alexopoulos, and L. Jansegers. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. Res. Vet. Sci. 67:223-228.
Madec, F., N. Bridoux, S. Bounaix, and A. Jestin. 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. Prev. Vet. Med. 35:53-72.

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

This experiment is not focused on differences in response parameters between (dietary) treatments, but is aimed at obtaining samples from piglets with and without PWD under commercial conditions. Little is known about the variation in protein fermentation during PWD under commercial conditions. We, therefore, performed power analyses with data from experiments focusing on high or low protein diets and diarrhea in weaned piglets. Using fecal score (Pieper et al., 2012a), fecal ammonia concentrations (Heo et al., 2009) and colonic ammonia concentrations (Heo et al., 2010) in the power analysis results in a requirement of 32, 22 and 32 piglets, respectively, to obtain a power of ≥0.8. We expect higher variation between animals under commercial conditions compared to experimental studies. Furthermore, variation in other read-out parameters are expected to be higher. Therefore, the variation in the power analyses with fecal and colonic ammonia concentration was multiplied with 3, which resulted in 166 and 262 animals, respectively. We, therefore, estimate to require 200 piglets for dissection. The main focus is on piglets with PWD and we expect greater variation in the PWD piglets, therefore, we anticipate to include 150 PWD piglets and 50 (non-PWD) control piglets.
In addition, we have consulted a statistician regarding numbers of animals and farms. There is variation between farms in incidence of PWD, and, therefore, we need to include multiple farms to obtain a representative sample of the Dutch piglet population. The inclusion of multiple farms allows us to include farm as an effect in the data analysis, in order to determine whether differences in the relation between PWD and protein fermentation (metabolites) occur between farms.
In addition, we will perform a pilot study before the start of this experiment, to determine the frequency and concentration of protein fermentation (end-products) in feces of piglets with diarrhea. This pilot study has been discussed with the Animal Welfare Body (work protocol "The concentration of protein fermentation end-products in faeces of piglets with post-weaning diarrhoea") and was not considered an animal experiment as referred to in the Dutch Act on Animal Experiments since the experimental procedures described in the protocol cause less pain or distress than the insertion of a needle under good veterinary practice. In short, in this pilot, fecal samples will be obtained from piglets in practice (multiple farms) with and without diarrhea. If piglets do not defecate spontanously when being handled, a fecal sample will be obtained via manual stimulation. Fecal consistency score and pH are determined in the fecal samples. Subsequently, fecal ammonia concentration is analyzed. Other protein fermentation end-products are also analyzed and correlated with ammonia to determine the appropriateness of fecal ammonia as an indicator of protein fermentation. These pilot data are required to determine the criteria for the selection of piglets with PWD in this experiment and will also be used to verify the required number of piglets, but we do not expect to require more than 200 piglets.

Data from this experiment will be analyzed using multivariate analyses. For instance, metabolomics data from piglets with and without PWD will be analyzed by partial least squares discriminant analysis. In addition, functional read-outs of gut function will be analyzed with principal component analysis and the following principal components will be subsequently related to protein fermentation indices.

References
Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2009. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. J. Anim. Sci. 87:2833-2843.
Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2010. Feeding a diet with a decreased protein content reduces both nitrogen content in the gastrointestinal tract and post-weaning diarrhoea, but does not affect apparent nitrogen digestibility in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim. Feed. Sci. Technol. 160:148-159.Pieper, R., S. Kröger, J. F. Richter, J. Wang, L. Martin, J. Bindelle, J. K. Htoo, D. von Smolinski, W. Vahjen, J. Zentek, and A. G. van Kessel. 2012. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. J. Nutr. 142:661-667.

## B. The animals

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

Piglets will be used in this experiment, because this is the target animal. This experiment is aimed at the variation present in the Dutch piglet population and, therefore, no appropriate model is available.

Piglets will be collected from multiple commercial farms. At each farm, we will select and kill piglets for sample collection. These selected piglets will include healthy control piglets (i.e. no diarrhea) and piglets with PWD. Sexe will be recorded, but is not used as a selection criterion, because it is not expected that PWD, and the relation with protein fermentation, differs between sexe. Potential differences in the ratio between male and female will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from commercial farms.
A total of 200 piglets will be sacrificed for sample collection. These 200 piglets will be selected based on criteria (i.e. fecal consistency, pH, ammonia concentration; verified in the pilot study) and in order to obtain these 200 piglets, rectal fecal samples will be collected from more piglets. In addition, to identify the presence of pathogens or microbial biomarkers before the onset of PWD, fecal samples will be collected from piglets in the pre-weaning and early post-weaning period as well. It is beforehand unknown which piglets will develop PWD. Assuming that the required 200 piglets will be obtained from 5 farms (i.e. 40 piglets per farm), with a division of 30 PWD and 10 control piglets at each farm, and a prevalence of 5% PWD on the day of selection for dissection, fecal samples in the pre-weaning / early post-weaning period should be collected from 600 piglets at each farm (i.e. 30 / 0.05 = 600 piglets/farm). This will in total be 600 x 5 = 3000 piglets from which feces will be sampled.
Selection and dissection of piglets (with and without PWD) will be between 3-14 days post-weaning, because this is the period in which the incidence of PWD is highest.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Mild | 200 | |

**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.

Replacement: the piglet is the target animal in this experiment. This experiment is aimed at the variation present in the Dutch piglet population and, therefore, no appropriate model is available. Reduction: the number of animals is based on power analyses and this number will be verified with a pilot study. Refinement: the selection of piglets will be based on minimal invasive measures, i.e. clinical signs of PWD and rectal fecal samples. The attempts to obtain a fecal sample are confined to 3 at each time point. Killing of the piglets will be performed by skilled personnel to minimize stress.

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

Animals will be obtained from commercial farms. Individual sows and pre-weaning piglets are not included in this experiment when they have been treated with antibiotics. In the post-weaning period of sample collection, (group) antimicrobial treatments for PWD should be withheld, because treatments will affect microbial composition and microbial metabolite production and the development of PWD. In case of individual diseased piglets (other than diarrhea), there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. After piglets are killed and sampled this experiment is finished and potential required treatments can again be applied when advised by a veterinarian according to normal Dutch legislation. Killing and dissection of piglets is performed by skilled personnel.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature overview has been made and the literature search (using google scholar) included the key words piglets, post-weaning diarrhea, gut health, dietary protein and protein fermentation. To the best of our knowledge, associations between PWD, protein fermentation and gut function measures have not been determined in commercial settings before. In addition, this project has been peer-reviewed by 5 independent reviewers and this on-farm approach was highly encouraged by the reviewers.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The piglets in this experiment are obtained from commercial farms and, therefore, piglets are kept under commercial conditions and not all housing conditions of Annex III of the Directive 2010/63/EU are met: - 3.1b. The piglets are checked daily by the respective farmer or a qualified person (Wod), and sick piglets will be noted. Piglets with PWD cannot be treated immediately, because our objective is to determine the mechanisms underlying diarrhea in piglets, including microbial composition and production of microbial metabolites, and antibiotic treatment will interfere with

these measurements. - 3.3b and 3.6a: no bedding material will be provided. Environmental enrichment will be as usual at each specific farm. - Table 7.3: the surface area for piglets will be according to commercial conditions.

**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.
[X] Yes > Describe this establishment.

The experiment will take place at commercial pig farms, which are not official establishments licensed by the NVWA.

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

Piglets will be sampled and dissected at commercial pig farms. It is of importance that the conditions are in agreement with commercial practices. Before piglet selection and dissection, the respective farm personnel will perform daily routine inspections. Fecal samples before dissection are collected by a qualified person (Wod). Killing and dissection will be performed by qualified persons.

# Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

Selected piglets will be blood-sampled and killed for sampling of tissues and intestinal digesta. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

During the (post-weaning) period of fecal sampling and until dissection, no antimicrobial treatments should be provided for PWD. This might result in a higher incidence or severity of PWD.

Explain why these effects may emerge.

Withholding antimicrobial treatments might increase the incidence or severity of PWD.

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

Antimicrobial treatments cannot be applied because these treatments will interfere with the measurements. No specific measures are taken to minimize adverse effects, but piglets will be inspected daily by the respective farm personnel. In case of diseased piglets (other than diarrhea), there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. At each specific farm, the day of selection and dissection will be determined following discussion with the respective farmer, to determine the day at which PWD prevalence is usually highest. Our experience is that this is usually around 4-7 days post-weaning. Assuming the onset of PWD is at 3-4 days post-weaning, this means that the period of not treating piglets is kept between 1-3 days, However, the exact window of selection and dissection will be determined with the respective farmer, but will be at maximum until day 14 post-weaning.

## 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.

Antimicrobial treatments (for PWD) should be withheld in de post-weaning period, because antibiotics will interfere with the measurements. In case of sick piglets, there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. For instance, piglets showing severe lethargy can be euthanized when advised by the veterinarian.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of humane endpoints to occur in the post-weaning period is estimated at 3%, i.e. slightly higher than the average mortality rate in the Dutch weaned piglet population of 2.2%.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort in this experiment is estimated to be mild. Experimental conditions are according to commercial settings, except that no antimicrobial treatments can be provided in the sampling period (mild). Discomfort related to rectal fecal sampling, blood sampling and killing is also estimated as 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.

Piglets need to be killed in order to collect the required samples.

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

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

[X] Yes

5.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>2 | Type of animal procedure<br>Digestibility experiment with piglets |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this experiment is to test the effect of sanitary conditions, dietary crude protein (CP), and their interaction, on CP digestion and fermentation, fermentation end-products, and piglet performance. The experiment will be designed in a 2 x 2 factorial arrangement with sanitary conditions (high, HSC; or low, LSC) and dietary digestible CP content (high, HCP; or low, LCP) as factors. Output parameters will be ileal and total tract nutrient digestibility, feces quality (consistency score, dry matter content, and pH), body weight gain, and feed efficiency. In addition, metabolites of protein fermentation (e.g. ammonia, amines, phenols and sulfides) in feces will be measured.

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

The contrast in sub-clinical health status will be according to van der Meer et al. (2016). Briefly, piglets will be obtained from a commercial nursery farm in the Netherlands. At 4 weeks of age, piglets will be transported to the experimental farm and allocated to LSC or HSC treatments. At arrival, piglets will be weighed and HSC piglets will receive antibiotic and anthelmintic treatments, whereas LSC piglets will remain untreated. HSC and LSC piglets are housed in separate rooms. HSC piglets will be housed in thoroughly cleaned and disinfected pens and a strict hygiene protocol (including showering, change of clothes, hairnet, and face mask) will be adhered when entering the HSC room [redacted]). A mixture of manure of commercial pig farms will be spread weekly in the LSC pens to increase pathogenic pressure and no hygiene protocol will be applied ([redacted] unpublished). In addition, LSC piglets will be exposed to nylon bags containing a mixture of pig manure and straw, ground to pass a 1 mm screen, as a model for dust ([redacted] unpublished).
From arrival until 6 weeks of age, piglets will receive the same weaner diets as they received in the nursery farm. From 6 weeks of age, experimental piglet diets will be fed. Within sanitary status, pens of pigs will be randomly assigned to LP or HP diets. Diets will be fed for 4 weeks.
At 10 weeks of age, piglets will be sacrificed and intestinal contents from the ileum and colon will be collected. At maximum 48 h before dissection, piglets will be housed individually and will be adapted to frequent feeding. Starting from 24h before dissection, pigs will be frequently fed (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. Our experience is that if pigs are used to meal feeding and will remain on the same diet, pigs will readily adapt to individual housing and frequent feeding.

References

van der Meer, Lammers, Jansman, Rijnen, Hendriks, and Gerrits. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. J Anim Sci (2016) 94:4704-4719. [redacted].

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

The number of replicate pens per treatment has been calculated by power analysis (Proc Power; SAS 9.3) using data from a previous experiment with comparable design (with 6 piglets per pen; [redacted]). Because ileal CP is considered a main output parameter for the current experiment, this parameter is used for the power analysis. In the previous experiment, only total tract CP digestibility was measured ([redacted]). From literature (de Vries et al, 2014), it is calculated that the variation in ileal CP digestibility measurements is 3 x larger than total tract CP digestibility measurements. Assuming a residual standard deviation of 4.4 (3 x 1.47; [redacted]) and averages of ileal CP digestibility of 70, 82, 79, and 85% for the four treatments, it follows that n=9 at a power of 0.8. The standard deviation used in the power analysis is based on the study of [redacted]) where 6 piglets per pen were used. We, therefore, include 6 piglets per pen as well. This number of piglets per pen also resembles the practical situation.

References

[redacted].de Vries, Pustjens, van Rooijen, Kabel, Hendriks, and Gerrits. Effects of acid-extrusion on the degradability of maize dried distillers grain with solubles in pigs. J Anim Sci (2014) 92:5496-5506.

**B. The animals**

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

In total, 216 female piglets will be used in this experiment divided over 3 batches (72 piglets per batch). Piglets will be housed with 6 piglets per pen and pen will be considered the experimental unit. The 4 dietary treatments will be tested in 3 pens each batch, resulting in 9 replicates per treatment.
Piglets will be obtained from a commercial nursery at 4 weeks of age and remain in the experimental facilities until 10 weeks of age.
Only female piglets will be used to exclude a potential effect of sexe. Because female animals generally respond more intense to immune interventions than male animals, we have chosen to use female piglets to maximize contrasts between treatments. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial farm.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|

| | | |
|---|---|---|
| Pigs | Mild | 216 |

**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.

Replacement: The piglet is the target animal in this experiment. The interaction between sanitary status and protein fermentation cannot be tested with ex vivo techniques. Hence, it was chosen to test this in an in vivo experiment. Reduction: The number of piglets to be used has been based on previous observations and is minimized to the number needed to detect differences between the treatments. Contrasts between the treatments are maximized within the range observed in practical settings, to minimize the number of piglets needed. Refinement: Piglets will be group-housed for the major the part of the study and the duration of individual housing is limited to 48h to minimize discomfort. In addition, during individual housing, pigs will be able to see and hear each other, have snout contact and will receive toys as enrichment.

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

All animal handling procedures will be conducted by experienced staff (feeding, weighing, transport). Various, non-destructible toys will be made available to the pigs as environmental enrichment, both during group- and individual housing, and toys will be alternated regularly. Occurence of clinical health issues due to sanitary conditions is not expected based on previous studies (van der Meer et al 2014 and [redacted]

unpublished). However, in case of clinical signs of illness, there will be discussion between researchers, animal caretakers and a veterinarian to determine is further measures are required. No exceptional adverse effects of this experiment on the environment are expected.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature overview on this topic has been performed. To the best of our knowledge, the interactive effects of sanitary conditions and dietary protein level on protein fermentation and its end-products has not been performed previously. If newly published papers indicate novel insights in the topic that have not been taken into account but are of relevance for the proposed experimental design, experimental procedures will be reconsidered.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Housing and care is according to Annex III, except during the last 48h of the experiment, when pigs will be housed individually in pens. Individual housing during this period is needed to make sure that every animal consumes feed at each time point a meal is given (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. The floor area of the pens in which pigs will be individually housed, will be min. 2 m2, allowing the pigs to move around freely. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Pigs will be able to see and hear each other and have snout contact. Animals will receive toys as enrichment.

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

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

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

[X] No > Continue with question H.
[] Yes > Describe this establishment.

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

# Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

Pigs might experience pain during killing. The potential pain is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

Previous studies using the same contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2014; and [redacted]., unpublished) did induce differences in sub-clinical health status. It is possible that piglets in the low sanitary status treatment develop clinical health problems, however, the

previous studies (van der Meer et al., 2014; and [redacted]., unpublished) showed no adverse effects of the low sanitary status on animal welfare. Pigs might experience stress as a result from individual housing.

Explain why these effects may emerge.

The potential adverse effects can occur due to the sanitary conditions. Individual housing is required to feed individually and frequently to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract.

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

Occurence of clinical health issues due to sanitary conditions is not expected based on previous studies ([redacted]). In case of clinical signs of illness, there will be discussion between researchers, animal caretakers and a veterinarian to determine is further measures are required. The period of individual housing is restricted to 48h and pigs will be able to see and hear each other, have snout contact and pigs will receive toys as enrichment.

**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.

Based on previous studies using the same contrasts in sanitary conditions [redacted]), the procedures are not expected to give rise to circumstances that require humane endpoints. In the case of clinical illness in the expert opinion of the veterinarian, animals will be removed from the experiment.

Indicate the likely incidence.

Based on our previous experiments the likely incidence is estimated to be below 5%.

**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 expected level of discomfort is classified as mild. The low sanitary conditions treatment may result in a lower sub-clinical health status. Based on previous studies using the same contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2014 and [redacted]), the level of discomfort for the LSC treatment is judged as 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.

Pigs will be killed and dissected after the procedures. This is necessary to obtain samples for digestibility measurements.

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

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

[X] Yes

6.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>3 | Type of animal procedure<br>Digestibility experiment with cannulated pigs |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this experiment is to test the effect of fermentable fiber (FF), crude protein (CP), and their interaction, on the extent of fermentation, fermentation end-products, microbial colonization, digesta passage rate, and feces quality. The experiment will be designed in a 3 x 2 factorial arrangement with dietary FF content (low FF, high FF, low FF+FF infused in colon) and CP (two protein isolates varying in protein structure) entering the colon as factors. The selection of protein sources will depend on the data obtained in appendix 7. Diets will have low or high FF contents. Apart from affecting fermentation in the large intestine, dietary FF will affect endogenous protein losses, fermentation, and microbial biomass in the small intestine, thereby changing the substrate arriving at the colon. A third treatment where the low FF is fed and FF is infused in the colon, will be tested to separate the effects of FF in the small intestine from fermentation characteristics in the large intestine. Output parameters will be total tract nutrient digestibility, digesta retention time in the large intestine, feces quality (consistency score, dry matter content, and pH), and microbiota composition in feces. In addition, a combination of targeted and untargeted metabolomics in feces and blood samples will be used to measure metabolites of protein fermentation.

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

After arrival, pigs will be allowed to acclimatize to the new environment for a minimum of 8 days. Fecal grab samples are taken and analyzed for the presence of parasites. If required pigs will receive anthelmintic treatment. During the acclimatization periods, pigs will be socialized according to a fixed protocol. Pigs will be surgically fitted with a cannula in the distal ileum and a catheter in the jugular vein. After surgery pigs are allowed to recover and adapt to the housing conditions for a minimum of 7 days before they are switched to the experimental diets. After recovery from surgery, the experimental phase will start and samples will be collected from each pig during 6 subsequent measurement periods. This approach is selected to allow within pig comparisons of the dietary treatments (Latin square design), minimizing the total duration of the experiment, thereby the risk of cannula and catheter complications. Each period will consist of 5 days adaptation to the experimental diet, followed by collection of ileal digesta during 12 hours on days 6 and 7, infusion of protein/fermentable fiber and markers to estimate mean retention time of the digesta into the colon (via the cannulas) at day 8 and urine+feces collection and blood sampling (via the catheter) at days 9-11. Such a time frame (6 periods x 11 days) is commonly used in studies with ileal cannulated growing pigs. To collect feces quantitatively, plastic bags will be attached to the rear end of the pigs as described by Van Kleef et al. (1994). Clean urine will be quantitatively collected using funnels underneath the cage.

Reference

van Kleef, Deuring, and van Leeuwen. A new method of faeces collection in the pig. Lab Anim (1994) 28: 78-79.

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

The number of replicates per treatment has been based on literature where similar output parameters were studied (Bach Knudsen et al. 2007; de Vries et al. 2016; Otto et al. 2003, Wilfart et al. 2007). For the most important parameters, power was calculated for several experimental design scenarios according to the method of Stroup (1999), using the data presented in these studies. It was concluded that a 6x6 Latin square design gave sufficient power (between 0.8 and 0.9) for the most important parameters (nutrient digestibility, SCFA concentrations in peripheral blood, large intestinal retention time).

References

Bach Knudsen, Jørgensen, and Canibe. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. Br J Nutr (2007) 84:449-458.
de Vries, β-Glucans and resistant starch alter the fermentation of recalcitrant fibers in growing pigs. PlosOne (2016) 11: e0167624.
Otto, Yokoyama, Hengemuehle, Bermuth, van Kempen, and Trottier. Ammonia, volatile fatty acids, phenolics, and odor offensiveness in manure from growing pigs fed diets reduced in protein concentration. J Anim Sci (2003) 81: 1754-1763.
Wilfart, Montagne, Simmins, Noblet, and van Milgen. Br J Nutr (2007) 98:54-62.
Stroup. Mixed model procedures to assess power, precision, and sample size in the design of experiments. Proc Biopharm Am Stat Assoc (1999) 15-24.

**B. The animals**

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

Eight barrows (approximately 25 kg) will be obtained from a commercial pig farm. Only pigs that are healthy without hernias (testicular or umbilical), damaged ears or unsound feet are selected, because these can complicate surgery. Surgery will be performed on 8 pigs. Two pigs will be considered spare animals and will be used in the case of problems with digesta collections or catheter patency. If pigs are replaced by spare pigs during the experiment, observations can be included in the statistical analyses, provided that these pigs have been used for at least two of the experimental periods. Should problems arise during the last period, the measurement period will be extended by one period. Pigs will be approximately 60-70 kg at the end of the experiment.
Barrows will be used so that urine and feces can be collected separately. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial farm.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Moderate | 8 | |

**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.

Replacement: The pig is the target animal in this experiment. Although fermentation can be tested in vitro, the complex interactive effects of dietary protein and fermentable fiber with passage rate and bacterial colonization on fermentative processes cannot be tested with ex vivo techniques. Hence, it was chosen to test this in an in vivo experiment. Reduction: A Latin square design is used to minimize the number of pigs needed. Refinement: Before surgery pigs will be socialized for a minimum of 5 days (according to a socialization protocol), so that they are well adapted to handling procedures after surgery and during sampling.

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

Surgical procedures will be conducted under complete anesthesia, and adequate analgesia are used during recovery. No exceptional adverse effects of this experiment on the environment are expected.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature overview on this topic has been performed. To the best of our knowledge, the interactive effects of fermentable fiber and dietary protein structure on the combination of protein fermentation, its end-products and passage rate and digestibility have not been performed previously. If newly published papers indicate novel insights in the topic that have not been taken into account but are of relevance for the proposed experimental design, experimental procedures will be reconsidered.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental period. The floor area of the pens will be min. 2 m2, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas and catheters of pen mates. Pigs will be able to see and hear each

other. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Animals will receive toys as enrichment, which are regularly changed.

**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.

Surgical procedures will be performed under anesthesia. After surgery, animals will be treated with analgesia for at least 3 days and with antibiotics. The potential pain experienced during killing is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

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

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

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

Individual housing, fasting prior to surgery and recovery from surgical procedures may have adverse effects on animal welfare. Infection and inflammation due to the presence of the cannula and/or catheter may occur.

Explain why these effects may emerge.

These adverse effects may emerge because they are part of the experimental procedures.

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

Infection and inflammation will be prevented or minimised by providing antibiotics after the surgical procedures and whenever required based on clinical signs of infection. Long-term effects of antibiotic treatment on the microbiota are minimised by administering the antibiotics intramusculair/in the wound (and not orally) and by allowing a recovery period of (a minimum of) 7 days and an adaptation period of 5 days to the diet. Adverse effects on animal welfare due to individual housing are minimised by providing toys as environmental enrichment and pigs will be able to see and hear each other.

## 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.

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized in the following situations: • During recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days and subsequently produce feces, indicating blockage of the intestines. • A cannula is lost and cannot be placed back. • A pig has fever during 5 successive days, is not responding to treatments proposed by a veterinarian, and shows signs of infection and inflammation. • A pig has feed refusals exceeding 20% of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days. • In the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25%.

## K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected as follows: • Surgical procedures: moderate • Sampling procedures (9.5 weeks): mild • Individual housing in the absence of bedding material in large metabolism pens (11 weeks): moderate. The cumulative discomfort in this experiment is estimated at moderate.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Pigs will be killed after the procedures. Keeping pigs with a cannula is complicated. Moreover, the location of the cannula and tip of catheter need to be verified during autopsy.

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

7.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>4 | Type of animal procedure<br>Protein digestibility of different feed ingredients and the metabolic fingerprints of broilers fed these diets |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this experiment is to determine which unknown metabolites can be correlated to hind gut protein fermentation in broilers, as well as determine the potential of different protein sources to contribute to hind gut protein fermentation. Protein fermentation is likely involved in the occurrence of gut health problems and of diarrhea.

**Experimental diets**
Broilers will be fed, from hatch to 29 days of age, different experimental diets in a 3x2 complete randomized block design. The diets will consist of one of 3 different protein sources (from ingredients currently used in poultry feed), at 2 levels of ileal protein digestibility. In vitro tests (in vitro pre-digestion, to simulate gastric and enteric digestion, followed by gas production method, to simulate hind gut fermentation) will be used prior to the feed trial to determine which protein sources will be added into the experimental diets and which method(s) of creating poorer digestible proteins will be used.

**Read-out parameters**
The following measurements will be recorded:

- performance measurements (feed intake, water intake, weight gain)
- litter and cloaca scores
- ileal & fecal crude protein and amino acids digestibility (marker method)
- Di-animo-pimelic acid (DAPA), indicator of microbial biomass, measured in ileal and cecal digesta
- untargeted metabolomics and biogenic amines targeted metabolomics (using serum, cecal and colon digesta)

- intestinal lesion scores
- relative organ weights (proventiculus, gizzard, duodenum, jujenum, ileum, ceca, colon, pancreas and liver)
- cecal digesta pH
- gut leakage (using serum marker: fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran)
- villus height and crypt depth
- microbiota population in ceca

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

Individual tags:

On day 0 all birds are given individual neck labels. This is necessary to allow us to link metabolic data from individual birds to their growth performance and individual gut health measures. Secondly, tagging is needed to guarantee we can separate birds if they accidentally mix at a young age.

Weighing & cloaca scores:
Individual weighing is done on day 0, 7, 14, 21 and 28. Simultaneously, a cloaca score is given each chick (1 minute/bird/time point). This is the most practical and least stressful method as they are only handled once per time point.

Fecal collection:

During the last 4 days of the trial broilers are placed on slats to allow for fecal collection. Prior to these last 4 days broilers will be housed on comfortable SoftCell bedding.

Blood sampling:
Prior to the dissection a single blood sample is taken from each broiler for metabolomics measurements. Blood samples are taken by an experienced technician.

Dissection:
Organs and digesta for the broilers will be collected for the above mentioned read-out parameters. Broilers are fasted 3 hours and then allowed to feed for 3 hours prior to euthanasia (on day 29), to ensure the presence of sufficient digesta in the different parts of the GIT (de Vries et al., 2014). Particularly for the determination of CP, amino-acids and markers in ileal digesta, large quantities of digesta are needed.

Reference
de Vries, S., Kwakkel, R.P., Pustjens, A.M., Kabel, M.A., Hendriks, W.H. and Gerrits W.J.J., 2014, Separation of digesta fractions complicates estimation of ileal digestibility using marker methods with Cr2O3 and cobalt-ethylenediamine tetraacetic acid in broiler chickens. Poultry Science 93:2010–2017

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

We will use an in vitro digestibility and fermentation trial prior to this trial to select feed ingredients and by doing so less experimental diets are included in this research. Selection of ingredients will be based on the contrast in hind gut protein fermentation that can be created. We will determine this by measuring a simulated ileal protein digestion and the soluble fraction that is left after digestion. As it is known that in poultry fractional separation occurs and that mostly the soluble components enter the ceca (de Vries et al., 2014), which is the main site of fermentation. The availability of protein for cecal bacteria in the undigested soluble fraction is then measured using the gas production technique (Cone et al., 2005). Both measures (digestibility and fermentibility) are used as selection criteria.

Sample size determination:

There are no metabolomics data available to use for sample size determination. Pre-cecal CP digestibility is our second most important read-out parameter. We also consider growth performance important measurements.

We consider a difference in digestibility of 2.5% between treatments to be relevant. We would like to detect differences with a significance level α = 5% and a power β = 80%.
In previous trials using male broilers, a standard deviation for ileal CP digestibility of 2.53% (Qaisrani et al., 2015) and 1.78% (personal communication) was found. This standard deviation is based on including 8 male broilers per pen. Based on this we assume σ = 2.15%.

Calculation of the number of replicate pens:

n = { [Z(α/2) + Zß]^2 } / [ (Δ/σ )^2 ]

Following formula will be used to determine sample size:

Using prerequisites, following values can be obtained from the Standard Normal Curves Areas table (Ott and Longnecker, 2010) or calculated:
Z0.05/2=1.96
Z0.80 = 0.85
Δ = 2.5
σ = 2.15

Thus:
n = (1.96 + 0.85)^2 / (2.5 / 2.15)^2 = 5.84

It can be deduced from this statistical power analysis that 6 repetitions are required per treatment group.

Number of birds per pen:

The variation used for the power analysis is based on previous studies (Qaisrani et al., 2015 and recent unpublished data) in which 8 male broilers per pen were used. Reducing the number of birds per pen may increase the variation between the pens, and will result in a higher number of pens required to obtain a minimal power of 80%.

For ileal CP and amino acid digestibility analysis we require at least 5 grams of digesta dry matter (personal communication). We should be able to obtain 1.14 g dry matter form the terminal ileum of a broiler (Kluth et al., 2005). Based on this information we can assume we will need to pool digesta of at least 5 birds and also in a previous trial (unpublished data) pooled digesta of 5 birds was enough for CP and amino acid analysis. Hence 8 birds should be sufficient for ileal digestibility measurements. In addition, 8 male broilers per pen will allow the detection of differences in growth performance between treatments.

In total 6 (3 diets x 2 degrees of protein digestibility) x 6 (replicate pens) x 8 (animals per pen) = 288 birds are required.

References

Cone, J.W., Jongbloed, A.W., Van Gelder, A.H. and de Lange L., 2005, Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. Ani. Feed Sci. Tech. 123-124:463-472Kluth, H., Mehlhorn, K. and Rodehutscord, M., 2005, Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. Archives of Animal Nutrition, 59(4):271-279
Ott, R.L. and Longnecker, M., 2010. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Brooks/Cole Cengage Learning, ISBN-13: 978-0-495-01758-5

Qaisrani, S.N., van Krimpen, M.M., Kwakkel, R.P., Verstegen, M.W.A. and Hendriks, W.H., 2015, Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers. Poultry Science 94:2152–2164

## B. The animals

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

Animals used will be *Gallus gallus domesticus* (domestic chickens), fast growing strain (Ross 308), males and will be obtained from a commercial hatchery. The species chosen is the target species of the study.

Gender related differences are not of interest in this study. To maintain maximum accuracy of measurements it is necessary to use birds with similar genetics and a similar gender. Since absorption of nutrients and metabolism are highly different between male and female chicks, the experiment is done in one sexe to decrease the variation in measurements. Males are preferred over females as they have a higher metabolic rate and feed intake, which should allow for more sample collection (digesta) per individual. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial hatchery.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Gallus gallus domesticus, Ross 308 | Mild. | 288 | |

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

**C. Re-use**

[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.

Replacement Broilers are the species of interest. The present animal experiment cannot be replaced by an experiment using another animal species due to the specificities of the avian digestive tract. A mechanistical modelling approach is excluded due to the complexity of interactions and modulators (largely still unknown) involved in protein fermentation. To our knowledge, such a model does not exist, let alone a model which can simulate the effects of protein fermentation on gut health and performance. As a consequence, this experiment has to be conducted with chickens. Reduction There are in vitro tests that aim to predict ileal protein digestibility and can be used for studying hind gut fermentation. These can, however, not replace the animal model, since they lack the interaction with the gut wall. Especially in these experiments where the effect on (gut-) health is studied, this interaction is highly relevant. In vitro tests will be used to get an indication of the order of possible protein fermentation, as described above. These in vitro tests will be used to determine feed ingredients prior to this trial, reducing the number of experimental groups required. Furthermore, we strive to collect as many samples (organs, blood, digesta) as possible from each individual chick, instead of using different chicks for different measurements. The number of replicates is determined using a sample size determination formula to ensure a minimal number of replicates is used while maintaining statistical power. Refinement We choose measurements that can be performed after killing of the birds and we reduced the time broilers spend on slats to just the last 4 days. Killing, blood sampling and neck labeling will be performed by experienced technicians.

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

Birds will be group housed in floor pens with SoftCell bedding (except during the last four days when they are group housed on slats without SoftCell bedding) and have perches. As mentioned above, invasive measurements during life other than a single blood sampling have been avoided. To our knowledge there are no environmental disadvantages to this trial.

# 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.

An extensive literature review has been conducted and very little is known about the mechanisms involved in protein fermentation and how this affects the animal's health. Also to the knowledge of the authors metabolic profiles related to protein fermentation in broilers have never been recorded. Knowledge of these metabolic profiles is expected to be very important in the improvement of gut health in farm animals and hence the reduction of antibiotic use.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Housing and care is according to Annex III, except during the last four days when birds will be housed on slats, which is needed for fecal collection. The perches will remain in the pens in this period.

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

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

[X] No > Continue with question H.
[] Yes > Describe this establishment.

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

# Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

Minor pain could be induced by neck labeling, blood sampling and euthanasia. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

Diarrhea might occur in the groups fed lower digestible proteins.

Explain why these effects may emerge.

Birds are fed lower digestible proteins as it is part of the aim of this study to investigate hind gut protein fermentation (which results from undigested proteins passing the ileum).

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

Other than lower dietary digestible protein in some of the treatment groups, all diets will be formulated to meet broiler requirements, with a similar fiber level. Fresh bedding will be provided after regular litter scores. Drinking nipples (checked daily) will be kept clean to avoid water spillage.

**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.

There is a very small chance of severe weight loss due to diarrhea. If a bird loses 10% or more of its body weight compared to the previous weighing, it is removed from the trial and killed according to a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU. If a bird shows clinical signs of sickness (diarrhea, inactivity, lack of appetite), there will be discussion between researchers, animal caretakers and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of this we expect to be very low (below 5%), as all diets will be formulated with sufficient nutrients for growth, although broilers fed the lower digestible proteins are expected to have a lower growth response.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort is classified as mild.

# End of experiment

**L. Method of killing**

**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.

This is required for the collection of ileal and cecal contents and organ samples.

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

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

[X] Yes

8.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>5 | Type of animal procedure<br>Feed strategies to reduce protein fermentation and alter metabolic fingerprint associated with protein fermentation in broilers |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The experiment described in appendix 4 should have given insight in the metabolic fingerprint of broilers associated with pre-cecal poorly digestible protein, which is expected to result in high hind gut protein fermentation. The aim of this experiment is to determine the effects some feed strategies (composition and processing) have on the metabolic fingerprint, protein fermentation associated metabolites and gut health of broilers.

**Experimental diets**

Broilers will be fed from hatch to 29 days of age, different experimental diets in a 2x2x2 design. Included factors are diet structure (particle size), fiber level and protein source. Fibers are known to be the preferred energy source of microbiota in the gut. In the presence of fibers, undigested proteins are not used as an energy source by the microbiota but can be used as a nitrogen source for microbial growth. Such a fiber feed strategy might reduce the production of (harmful) protein fermentation metabolites. A coarse dietary structure is expected to reduce passage rate and increase peristalsis and anti-peristalsis and therefore improve ileal protein digestibility. Further details of the diets will be determined based on the results of appendix 4 and the in vitro test (Boisson two-step, to simulate gastric and enteric digestion, followed by gas production method, to simulate hind gut fermentation). The contrast in dietary protein will be based on ileal crude protein and amino acid digestibility measures.

**Read-out parameters**

The following measurements will be recorded:

- Performance measurements (feed intake, water intake, weight gain)
- Untargeted and targeted metabolomics (using serum, cecal and colon digesta, we will be targeting metabolites that have been found to be associated with hind gut protein fermentation in experiment 1)
- Litter and cloaca scores
- Di-animo-pimelic acid (DAPA), indicator of microbial biomass, measured in ileal and cecal digesta
- Intestinal lesion scores
- Relative organ weights (proventiculus, gizzard, duodenum, jejenum, ileum, ceca, colon, pancreas and liver)
- Cecal digesta pH, gut leakage (using serum marker)
- Villus height and crypt depth
- Ileal and colon amino acid digestibility (marker method)
- Microbiota population in the ceca
- Passage rate

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

Individual tags:

On day 0 all birds are given individual neck labels. This is necessary to allow us to link metabolic data from individual birds to their growth performance. Secondly, tagging is needed to guarantee we can separate birds if they accidentally mix at a young age.

Weighing & cloaca scores:
Individual weighing is done on day 0, 7, 14, 21 and 28. Simultaneously, a cloaca score is given each chick (1 minute/bird/time point). This is the most practical and least stressful method as they are only handled once per time point.

Passage rate measurements:

5 broilers per pen will be orally dosed with 3 gel capsules containing 150 mg titanium (Ti) oxide at day 24. At each time point (30, 90, 180, 270 and 360 min. after oral dosage), one bird per pen is euthanized, after which the contents of the different gastro-intestinal segments are collected.

Fecal collection:
During the last 4 days of the trial broilers are placed on slats to allow for fecal collection. Prior to these last 4 days broilers will be housed on comfortable SoftCell bedding.

Blood sampling:
Prior to the dissection a single blood sample is taken from each broiler for metabolomics measurements. Blood samples are taken by an experienced technician.

Dissection:
Organs and digesta for the broilers will be collected for the above mentioned read-out parameters. Broilers are fasted 3 hours and then allowed to feed for 3 hours prior to euthanasia (on day 29), to ensure the presence of sufficient digesta in the different parts of the GIT (de Vries et al., 2014). Particularly for the determination of CP, amino-acids and markers in ileal digesta, large quantities of digesta are needed.

Reference: de Vries, S., Kwakkel, R.P., Pustjens, A.M., Kabel, M.A., Hendriks, W.H. and Gerrits W.J.J., 2014, Separation of digesta fractions complicates estimation of ileal digestibility using marker methods with Cr2O3 and cobalt-ethylenediamine tetraacetic acid in broiler chickens. Poultry Science 93:2010–2017

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

Number of replicate pens:

There are no metabolomics data available to use for sample size determination. Pre-cecal CP digestibility is our second most important read-out parameter. We consider a difference in digestibility of 2.5% between treatments to be relevant. We would like to detect differences with a significance level α = 5% and a power β = 80%. In previous trials a standard deviation for ileal CP digestibility in male broilers of 2.53% (Qaisrani et al., 2015) and 1.78% (personal communication) was found. Based on this we assume σ = 2.15%.

Calculation of the number of replicate pens:

$n = \{ [Z(\alpha/2) + Z\beta]^2 \} / [ (\Delta/\sigma )^2 ]$

Following formula will be used to determine sample size:

Using prerequisites, following values can be obtained from the Standard Normal Curves Areas table (Ott and Longnecker, 2010) or calculated:

$Z_{0.05/2}=1.96$

$Z_{0.80} = 0.85$

$\Delta = 2.5$

$\sigma = 2.15$

Thus:

$n = (1.96 + 0.85)^2 / (2.5 / 2.15)^2 = 5.84$

It can be deduced from this statistical power analysis that 6 repetitions are required per treatment group.

Number of birds per pen:

For ileal CP and amino acid digestibility analysis we require at least 5 grams of digesta dry matter. We should be able to obtain 1.14 g dry matter form the terminal ileum of a broiler (Kluth et al., 2005). Based on this information we can assume we will need to pool digesta of 5 birds.

For the passage rate measurements we will require 5 birds per pen which will be killed at different time points (van Krimpen et al., 2011).

We require different broilers to be used for digestibility and passage rate measurements because both measurements require total collection of digesta from gastrointestinal segments.
An additional broiler should be included in case of unexpected mortality.

Hence, 5+1+5 = 11 birds per pen are required. We know from previous trials (Qaisrani et al., 2015 and recent unpublished data) for significant measurement for FCR at least 8 male birds per pen are required. Hence 11 male birds should be sufficient also for FCR measurement.

In total 8 (treatments) x 6 (replicate pens) x 11 (animals per pen) = 528 birds are required.

References:

Qaisrani, S.N., van Krimpen, M.M., Kwakkel, R.P., Verstegen, M.W.A. and Hendriks, W.H., 2015, Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers. Poultry Science 94:2152–2164

Ott, R.L. and Longnecker, M., 2010. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Brooks/Cole Cengage Learning, ISBN-13: 978-0-495-01758-5

Kluth, H., Mehlhorn, K. and Rodehutscord, M., 2005, Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. Archives of Animal Nutrition, 59(4):271-279
Van Krimpen, M.M., Kwakkel, R.P., Van Der Peet-Schwering, C.M.C., Den Hartog, L.A. & Verstegen, M.W.A. (2011) Effects of dietary energy concentration, nonstarch polysaccharide concentration, and particle sizes of nonstarch polysaccharides on digesta mean retention time and gut development in laying hens. British Poultry Science 52:6.

**B. The animals**

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

Animals used will be *Gallus gallus domesticus* (domestic chicken), fast growing strain (Ross 308), males, ages from 0 days to slaughter age and will be obtained from a commercial hatchery. The species chosen is the target species of the study.

Gender related differences are not of interest in this study. To maintain maximum accuracy of measurements it is necessary to use birds with similar genetics and a similar gender. Since absorption of nutrients and metabolism are highly different between male and female chicks, the experiment is done in one sexe to decrease the variation in measurements. Males are preferred over females as they have a higher metabolic rate and feed intake, which should allow for more sample collection (digesta) per individual. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial hatchery.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Gallus gallus domesticus, Ross 308 | Mild | 528 | |

**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.

Replacement Broilers are the species of interest. The present animal experiment cannot be replaced by an experiment using another animal species due to the specificities of the avian digestive tract. A mechanistic modelling approach is excluded due to the complexity of interactions and modulators (largely still unknown) involved in protein fermentation. To our knowledge, such a model does not exist, let alone a model which can simulate the effects of protein fermentation on gut health and performance. As a consequence, this experiment has to be conducted with chickens. Reduction There are in vitro tests that aim to predict ileal protein digestibility and can be used for studying hind gut fermentation. These can, however, not replace the animal model, since they lack the interaction with the gut wall. Especially in these experiments where the effect on (gut-) health is studied, this interaction is highly relevant. Furthermore, we strive to collect as many samples (organs, blood, digesta) as possible from each individual chick, instead of using multiple birds for multiple measurements, reducing the number of birds required. Passage rate measurements, however, requires killing of birds a specific time points and use of all the digesta from all gastrointestinal tract segments, therefore these birds cannot be used for ileal digestibility analysis. The number of replicates is determined using a sample size determination formula to ensure a minimal number of replicates are used while maintaining statistical power. Refinement We choose measurements that can be performed after killing. Blood sampling and neck labling will be performed by experienced technicians.

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

Birds will be group housed throughout the trial, in floor pens with SoftCell bedding and have perches. During the last four days, when birds are housed on slats, perches will still be available. As mentioned above, invasive measurements during life, other than a single blood sampling, have been avoided. To our knowledge there are no environmental disadvantages to this trial.

# 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.

An extensive literature review has been conducted and very little is known about the mechanisms involved in protein fermentation and how this affects the animal's health. This experiment is a continuation of appendix 4 in which we aim to discover metabolic profiles related to protein fermentation. In this experiment we will examine how feeding strategies change these profiles and potentially, identify mechanisms underlying gut health. This knowledge is expected to be very important in the improvement of gut health in chickens and hence the reduction of antibiotic use.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Housing and care is according to Annex III, except during the last four days when birds will be housed on slats without bedding material, which is needed for fecal collection. The perches will remain in the pens in this period.

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

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

[X] No > Continue with question H.
[] Yes > Describe this establishment.

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

# Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.
[X] Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

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

Minor pain could be induced by neck labeling, blood sampling and euthanasia. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

Diarrhea might occur in the groups fed lower digestible proteins, lower fiber levels and pellets with fine particles.

Explain why these effects may emerge.

Birds are fed diet contrasting in protein digestibility, fiber content and structure as it is part of the aim of this study to investigate how these contrasts in feed affect hind gut protein fermentation and gut health.

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

Other than these contrasts, all diets will be formulated to meet broiler requirements. Fresh bedding will be provided after regular litter scores. Drinking nipples (checked daily) will be kept clean to avoid water spillage.

**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.

There is a very small chance of severe weight loss due to diarrhea. If a bird loses 10% or more of its body weight compared to the previous weighing, it is removed from the trial and killed according to a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU. If a bird shows clinical signs of sickness (diarrhea, inactivity, lack of appetite), there will be discussion between researchers, animal caretakers and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of this we expect to be very low (below 5%), as all diets will be formulated with sufficient nutrients for growth, although broilers fed the lower digestible proteins are expected to have a lower growth response.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort is classified as 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.

This is required for the collection of ileal and cecal contents and organ samples.

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

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

[X] Yes

8.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>6 | Type of animal procedure<br>Transgenerational effects of protein fermentation metabolites in poultry |

# 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.

Dietary protein fed to broiler breeders can affect broiler offspring performance (Rao et al., 2009). To date, the mechanisms by which broiler offspring is affected by maternal feeding is not known. We hypothesize that metabolites produced upon protein fermentation in the ceca of broiler breeders are absorbed and transferred to the eggs, which may cause imprinting in the broiler offspring decreasing intestine function.

**General design**

Thirty-two female broiler breeders will be group-housed and divided over two dietary treatments, differing in ileal protein digestibility to obtain a contrast in protein entering the ceca. Protein sources will be selected based on the outcome (i.e. ileal protein digestibility) of in vitro and in vivo broiler experiments described in appendix 4. These diets will be fed to broiler breeders for 5 weeks and, blood samples will be collected to determine (protein fermentation) metabolite profiles. In addition, broiler breeders will be weighed at the start and end of the feeding trial. Eggs will be collected from each individual broiler breeder in the last week(s) of the trial (i.e. week 4-5). Thereafter, broiler breeders are killed for sample collection to determine effects of dietary treatments on the gut.

Two eggs per broiler breeder are used to determine the metabolic profile in the eggs. Three eggs per broiler breeder are incubated, hatched and broiler offspring killed for sample collection (intestine, blood, liver).

**Primary outcome parameters**

Untargeted metabolomics and targeted (protein fermentation products) metabolomics will be performed in blood samples of broiler breeders, in the eggs (yolk and/or albumen) and in samples from the broiler offspring to determine changes in metabolites. Intestinal tissue samples of broiler breeders are used for morphology to determine the effects of the dietary treatment on the gut.

Samples obtained from broiler offspring at dissection (i.e. blood, organs, intestinal tissue) will be analysed on metabolite profiles and functional read-outs (i.e. morphology of intestinal samples, DNA methylation and histone modifications in intestine or liver samples). Metabolomics profiles of broiler breeders and broiler offspring are subsequently correlated with these gut parameters to establish potential pathways that are differentially activated/silenced by certain metabolites affecting gut health.

Reference

Rao, K., J. Xie, X. Yang, L. Chen, R. Grossmann, and R. Zhao. 2009. Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. Br. J. Nutr. 102:848-857.

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

Broiler breeders will be fed diets differing in ileal protein digestibility to determine transgenerational effects of protein fermentation metabolites.

**Broiler breeders**
Individual identification
Breeders will be marked with spray (not red) to enable individual identification of breeders within a pen.

Body weight
Broiler breeders will be weighed at the start and end of the feeding trial to determine potential differences in body weight between treatments. Individual birds will be placed in a crate and weighed on a weighing scale. Feed intake (per pen) will be recorded as well.

Blood sampling
At the start and end of the feeding trial, blood samples will be obtained from each broiler breeder to determine shifts in metabolite profiles due to the dietary treatments. Birds will be fixated by the animal caretaker and a blood sample will be taken from the wing vein by an experienced technician.

Artificial insemination
In order to obtain fertilized eggs, broiler breeders are inseminated. Semen will be obtained from multiple roosters from a commercial breeder company. The female broiler breeders will be inseminated twice a week in the first week and once a week in the weeks thereafter, with pooled semen.

**Eggs**
Eggs are collected in the last experimental week(s). During collection of eggs, breeders are observed continuously during that morning/day, in order to know which egg belongs to which breeder. This is required to link the egg metabolite profile to the breeder metabolite profile and still have group-housing. If there is uncertainty regarding which broiler breeder laid the egg, broiler breeders within the pen will be palpated to check the presence/absence of an egg.
Egg samples (yolk and/or albumen) are used for metabolomics analyses to determine the transfer of (protein fermentation) metabolites from broiler breeders to the eggs. The yolk sac metabolome will be analysed to understand the changes in available nutrients for the developing embryo.

**Broiler offspring**
Settable eggs will be incubated and hatched. A maximum of 96 day-old broiler chicks will be killed for sample collection (intestine, blood, liver).

This approach allows us to evaluate the effects of protein fermentation on gut morphology and metabolite profile of broiler breeders and, subsequently, evaluate if these broiler breeder metabolite profiles are correlated with the egg metabolite profiles, and with the broiler offspring metabolite profiles and functional read-outs of gut health.

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

Protein sources are selected based on the outcome of the in vitro tests and in vivo broiler experiment described in appendix 4, in order to obtain a contrast in ileal protein digestion between dietary treatments.
We chose artificial insemination instead of natural fertilization, because variation between broiler breeders in different pens might increase with natural fertilization due to differences in vitality between males. Furthermore, minimal required numbers of broiler breeders for primary outcome parameters are estimated based on previous experiments and power analysis (see next paragraph).

**B. The animals**

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

Ross 308 broiler breeder females will be obtained from a commercial breeding company. Ross 308 is the most commonly used breed in North-Western Europe. Broiler breeders will be obtained between 30-40 weeks of age, in order to perform the experiment in peak production.

The primary outcome parameters for this study are the metabolite profiles in the serum samples and eggs of broiler breeder females. To the best of our knowledge, metabolite profiles have not been determined in serum or eggs from broiler breeders fed different diets to induce protein fermentation. In the study from Pieper et al. (2012), metabolite profiles were determined in colon digesta and urine in weaned piglets fed diets differing in fermentable protein and total dietary fiber level (2x2 design). Using 8 piglets per treatment, they were able to find metabolite clusters associated with the diet and identify several metabolites that differed between treatments.
A power analysis we also conducted (using the glmpower procedure of SAS 9.3), using blood uric acid levels as influenced by dietary crude protein level reported by Corzo et al. (2005). Plasma uric acid levels averaged 6.04 and 3.82 mg/dL for broilers fed high (212 g/kg) or low (173 g/kg) crude protein level, respectively, with an average SD of 1.32. Using these values and setting the power at ≥ 0.8, this requires a total of 14 animals.
We expect larger variation in metabolite profiles, because we also apply untargeted metabolomics (instead of targeted as applied in the study of Pieper et al., 2012) and we also use eggs. We, therefore, estimate to require 16 broiler breeders per dietary treatment.
Two eggs are collected from each broiler breeder to determine metabolite profiles in the eggs. Additionally, we require two eggs for incubation and hatching to determine the effects on gut parameters in the broiler offspring. To account for unsettable eggs (~9%; van Emous et al., 2013) and a hatchability of settable eggs of 84% (van Emous et al., 2015), we collect/incubate 3 eggs per broiler breeder. These eggs are collected in one week, in order to minimize variation due to different storage times before incubation.

In total this experiment will include 32 broiler breeders and at max 96 broilers.

References

Corzo, A., C. A. Fritts, M. T. Kidd, and B. J. Kerr. 2005. Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crude protein diets. Anim. Feed. Sci. Technol. 118:319-327.
Pieper, R., K. Neumann, S. Kröger, J. F. Richter, J. Wang, L. Martin, J. Bindelle, J. K. Htoo, W. Vahjen, A. G. van Kessel, and J. Zentek. 2012. Influence of fermentable carbohydrates or protein on large intestinal and urinary metabolomic profiles in piglets. J. Anim. Sci. 90:34-36.
van Emous, R. A., R. P. Kwakkel, M. M. van Krimpen, and W. H. Hendriks. 2013. Effects of growth patterns and dietary crude protein levels during rearing on body composition and performance in broiler breeder females during the rearing and laying period. Poultry Sci. 92:2091-2100.
van Emous, R. A., R. P. Kwakkel, M. M. van Krimpen, H. van den Brand, and W. H. Hendriks. 2015. Effects of growth patterns and dietary protein levels during rearing of broiler breeders on fertility, hatchability, embryonic mortality, and offspring performance. Poultry Sci. 94:681-691.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Ross 308 broiler breeder females | Mild | 32 | |
| Ross 308 broiler offspring | Mild | 96 | |

**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.

Replacement: the broiler breeders are the target animal in this experiment. There are no appropriate models available to study the (protein fermentation) metabolites produced by broiler breeders, the transfer of these metabolites to the egg and the effects on the gut of the broiler offspring. Reduction: artificial insemination is used instead of natural fertilization in order to minimize variation due to differences in vitality between males. In addition, required numbers of animals are estimated based on literature and power analysis. Refinement: broiler breeders will be checked twice daily by qualified personnel on general health and behavior. In case of disease, this will be discussed between the researcher, animal caretaker, veterinarian and/or animal welfare officer to determine appropriate actions. Broiler breeders will be group-housed and will be provided with sufficient feeding- and drinking places, perches and bedding material. In addition, laying nests will be provided to the broiler breeders. Skilled personnel will handle the animals in order to minimize stress during procedures such as weighing and blood sampling. In addition, the light in the stable will be dimmed prior to catching the birds.

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

Birds are group-housed, provided with sufficient bedding material and will have perches. Birds will be checked twice daily on general health and behavior. Climate conditions will be checked twice daily as well and immediately adjusted if required. Dimming the light before handling the birds (for weighing, blood sampling) allows the birds to become calm. Fresh bedding material will be provided regularly, to minimize the risk of wet litter and ammonia emission.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature survey has been conducted using google scholar and key words including broiler, broiler breeder, dietary protein, protein fermentation, transgenerational and metabolic programming. Especially in rodent models, there is substantial evidence linking maternal nutrition to offspring health and disease. The mechanisms underlying such transgenerational effects remain largely unknown. In poultry, very little data are available on this topic. To the best of our knowledge, (serum) metabolome profiles in broiler breeders in relation to dietary protein and transfer of (protein fermentation) metabolites to eggs have not been determined before.

# 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, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Minor pain can be experienced during blood sampling and killing. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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 is a very small chance that broiler breeders might develop diarrhea due to the dietary treatments.

Explain why these effects may emerge.

A diet inducing protein fermentation is part of the experimental design. This diet is required to study (transgenerational) effects of protein fermentation metabolites.

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

Fresh bedding material will be provided regularly, to minimize the risk of wet litter (due to diarrhea) and subsequent effects on legs and skin of the broiler breeders.

**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.

Body weight loss due to diarrhea is possible in broiler breeders fed a protein source of low digestibility. If broiler breeders show clinical signs of diarrhea/sickness, birds will be weighed and birds are removed from the trial in case of 10% body weight loss (compared to the start weight). Injuries such as a broken wing or leg can occur similarly as in practice. If these injuries occur, these will be noticed during daily inspections. Birds are removed from the trial and killed according to a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is estimated at 1%.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort in this experiment is estimated to be mild. This is based on weighing (mild), blood sampling (mild) and artificial insemination (mild) of broiler breeders and killing of broiler breeders and offspring.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Broiler breeders and broiler offspring are killed to collect samples (i.e. intestinal tissues).

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

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

[X] Yes

10.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>7 | Type of animal procedure<br>Uremic toxin production during the in vitro fermentation of proteins in ileal digesta |

# 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.

Eight pigs will be fitted with a cannula in the distal ileum. After a recovery and adaptation period, pigs will be subjected to eight experimental diets in 8 periods in a latin-square design. These diets will differ in dietary protein source and/or structure (i.e. amino acid composition). These proteins will be selected based on data from literature and from the results of the in vitro study described in appendix 4. During each period, ileal effluents will be collected and pooled by diet for further in vitro analysis. As a secondary objective fecal samples and clean urine samples will be analyzed for uremic toxins, the end-products of protein fermentation.

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

Eight growing barrows, ± 25 kg BW will be fitted with a cannula in the distal ileum under inhalation anesthesia. Pigs will be fasted prior to the surgery and will be treated with adequate painkillers and antibiotics during recovery. Pigs will be allowed to recover from the surgery and to adapt to housing conditions for a minimum of 7 days. After recovery from surgery, ileal effluents will be collected from each pig during 8 subsequent measurement periods. Each period will consist of a 5 day adaptation period, followed by collection of ileal digesta during 12 hours on days 5 and 7. Ileal digesta will be pooled per pig over the experimental period and diet will be stored at -20°C pending analysis. This approach is selected to ensure the ileal digesta for further in vitro studies is originating from the same pigs. The latin-square approach minimizes the number of pigs needed for this study, and has also been proposed by the expert working group of the FAO (2014). Feces will be sampled by rectal sampling during day 3, 4 and 6 and urine samples will be collected from funnels mounted underneath the metabolism cage.

Reference:
Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods; Report of a FAO Expert Working Group, ISBN 978-92-5-108695-7, FAO 2014

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

This experiment is not designed to detect statistically significant differences in the composition of ileal digesta among protein sources. It is designed to provide representative samples of ileal digesta of the selected protein sources, with the objective to further study the fermentation of the undigested proteins in these samples. Hence, ileal digesta harvested from the pigs will be pooled by dietary treatment for the analysis of amino acid composition and will be the basis for a series of in vitro studies into the production of uremic toxins during fermentation (not described in this application). In addition, the effects of the protein sources on fecal characteristics and urinary excretion of uremic toxins will be analysed following a normal latin-square design.

**B. The animals**

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

Eight growing barrows (± 25 kg BW) will be purchased from a commercial pig farm. Only pigs that are healthy without hernias (testicular or umbilical), damaged ears or unsound feet are selected, because these can complicate surgery. Male animals will be used to ease collection of feces without contamination with urine. Barrows will be used as entire males will be difficult to handle at the end of the trials. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial farm. No spare pigs will be used, but in case no samples can be collected from two pigs for at least two periods, an extra collection period will be added. Pigs will be about 30 kg BW at the onset of the trial, and 60-70 kg BW at the end of the trial. This is a comparable BW range as used previously at our facilities, and well within the range of BW, maintaining healthy pigs and functional cannulas used in published literature. The use of growing pigs for this research is recommended by the FAO (2013). Body weight will be determined upon arrival of the pigs, and after surgery weekly until the end of the last experimental period.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Moderate | 8 | |

**C. Re-use**

**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.

Replacement: In this experiment, the connection with protein fermentation in the renal transplant cohort of the [redacted] is important. Obtaining ileal effluents from humans is complicated, and the pig is recommended by the FAO committee as a model for evaluating Digestible Indispensable Amino Acid Scores (DIAAS) of human foods. This choice is well documented in the FAO report (2013 ). Reduction: The protein sources used in this experiment will be selected based on the in vitro (small intestinal) digestion study described in appendix 4, to ensure a contrast in amino acid composition of ileal digesta large enough for this study. Using a latin-square design, within pig variability can be separated from the variation between protein sources, hence minimizing the number of pigs to be used for the study of uremic toxin excretion, and that the pooled ileal digesta to be used for subsequent in vitro fermentation studies originate from the same pigs. Refinement: after careful consideration, the length of the adaptation period, depending on the number of days the animal needs for adapting to new diets between experimental periods, was reduced from 12 to 5 days. In this way, every period within each trial lasts 7 days instead of 14 days, reducing the total duration of each trial to 8 weeks, which is often used for evaluating effects of fibrous diets. This decision fits within the procedures proposed by the FAO (2014), and is based on the notion that adaptation of small intestinal passage rates and digestive secretions to different protein sources is much quicker than the adaptation of the colon microbiota to changes in fiber sources. Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs, in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained.

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

Surgical procedures will be conducted under complete anesthesia, and adequate painkillers are used during recovery.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature search has been performed in Scopus (13-4-2017), using the search terms "uremic toxin", "protein fermentation". Although the production of uremic toxin following protein fermentation is well documented (particularly in relation to kidney patients), no efforts have been published predicting the composition of uremic toxins from variation in the amino acid composition of proteins flowing into the colon. No literature sources were found with similar objectives as described in this appendix.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental periods. The floor area of the pens will be min. 2 m2, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas of pen mates, but audio-visual contact will be possible. The use of bedding material is avoided as this will prevent the collection of clean urine samples from funnels mounted underneath the cage.

**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?

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

[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, analgesiaor 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.

Surgical procedure will be performed under anesthesia. After surgery, animals will be treated with painkillers (at least 3 days) and with antibiotics.

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

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

Individual housing without bedding material, fasting prior to surgery and recovery from surgical procedures may have adverse effects on animal welfare. Infection and inflammation due to the presence of the cannula and/or catheter may occur. Digestive problems (i.e.diarrhea) with changes in the diet are not expected based on previous experience and because there is an adapatation period to each diet.

Explain why these effects may emerge.

These adverse effects may emerge because they are part of the experimental procedures.

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

Infection and inflammation will be prevented or minimised by providing antibiotics after the surgical procedures and whenever required based on clinical signs of infection. Adverse effects on animal welfare due to individual housing are minimised by providing toys as environmental enrichment and pigs will be able to see and hear each other.

**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.

The following human endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply: • during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce feces, indicating blockage of the intestines or inflammation of the peritoneum. •a cannula is lost and it cannot be placed back into the distal ileum immediately. • a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation. • a pig has feed refusals exceeding 20% of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days. • in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results. • a pig suffers from body weight loss during a 14 day period

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% during the 8 week duration of the trial. The major portion of this 25% is expected to occur during the first two days following surgery. In addition, technical failure of cannulas will lead to removal of the pig from the experiment. If this leads to discomfort of the pig, it will be for a very short period of time.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Surgical procedure (including fasting): moderate • Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (10 weeks): moderate • The sampling procedures of ileal digesta (2 days during each of 8 subsequent weeks): mild • Rectal fecal sampling during 3 days (when ileal digesta are not collected): mild. Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Keeping pigs with a cannula in the distal ileum after the experiment is finished is undesirable from an animal welfare point of view.

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

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

[X] Yes

Centrale Commissie Dierproeven

11.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AW WAGENINGEN

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

**Onze referentie**
Aanvraagnummer
AVD1040020171667

**Bijlagen**
2

Datum 10 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 mei 2017. Het gaat om uw project "To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1040020171667. 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:**
10 mei 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1040020171667

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**
10 mei 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1040020171667

## Gegevens aanvrager

| | |
|---|---|
| Uw gegevens | |
| Deelnemersnummer NVWA: | 10400 |
| Naam instelling of organisatie: | Wageningen University & Research |
| Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: | [redacted] |
| KvK-nummer: | 9215846 |
| Straat en huisnummer: | Akkermaalsbos 12 |
| Postbus: | 59 |
| Postcode en plaats: | 6700 AW WAGENINGEN |
| IBAN: | NL10RABO0397066465 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer: | Wageningen UR |

| | |
|---|---|
| Gegevens verantwoordelijke onderzoeker | |
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | Onderzoeker |
| Afdeling: | [redacted] |
| Telefoonnummer: | [redacted] |
| E-mailadres: | [redacted] |

**Datum:**
10 mei 2017
**Aanvraagnummer:**
NVWA040020171667

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

| | |
|---|---|
| Geplande startdatum: | 1 mei 2017 |
| Geplande einddatum: | 1 mei 2021 |
| Titel project: | To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry |
| Titel niet-technische samenvatting: | Het bepalen van de relatie tussen eiwitfermentatie en darmgezondheid in varkens en pluimvee |
| Naam DEC: | DEC Wageningen UR |
| Postadres DEC: | Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres DEC: | dec@wur.nl |

**Betaalgegevens**

| | |
|---|---|
| De leges bedragen: | € 2.113,- |
| De leges voldoet u: | na ontvangst van de factuur |

**Checklist bijlagen**

| | |
|---|---|
| Verplichte bijlagen: | [x] Projectvoorstel<br>[x] Beschrijving Dierproeven<br>[x] Niet-technische samenvatting |

**Ondertekening**

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | [redacted] |
| Plaats: | Wageningen |
| Datum: | 10 mei 2017 |

Centrale Commissie Dierproeven

12.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AW WAGENINGEN

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

**Onze referentie**
Aanvraagnummer
AVD1040020171667

Datum 26 juni 2017
Betreft Vervolg aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 10 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "To determine the relation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry" met aanvraagnummer AVD1040020171667. Wij gaan uw aanvraag beoordelen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Complexe aanvraag**
Tijdens de beoordeling van uw aanvraag blijkt dit project dermate complex te zijn dat meer tijd nodig is om de aanvraag volledig te beoordelen. Als wij nog informatie nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. U krijgt binnen vijfenvijftig werkdagen nadat uw aanvraag compleet is, een beslissing op uw aanvraag. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

WAGENINGEN UR
For quality of life

13.

Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
25 juli 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD1040020171667

ONS KENMERK
AVD1040020171667

POSTADRES
Postbus 65
8200 AB Lelystad

BEZOEKADRES
Houtribweg 39
8221 RA Lelystad

INTERNET
www.wur.nl

KvK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON
ing. I.E. Leushuis-Kappers

TELEFOON
+31 (0)320-238170

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

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

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer: **AVD1040020171667**
2. Titel van het project: To determine the relation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry
3. Titel van de NTS: Het bepalen van de relatie tussen eiwitfermentatie en darmgezondheid in varkens en pluimvee
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
   DEC-WUR
   0317-481516
   Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
   Ontvangen door DEC: 10-05-2017
   Aanvraag compleet: ja
   In vergadering besproken: 15-05-2017 en 17-07-2017
   Anderszins behandeld:
   Termijnonderbrekingen van 16-05-2017 tot 16-06-2017, van 20-06-2017 tot 10-07-2017, van 19-07-2017 tot 20-07-2017
   Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: 26-06-2017
   Aanpassing aanvraag: 16-06-2017 en 20-07-2017
   Advies aan CCD:
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.

Wageningen University & Research is specialised in the domain of healthy food and living environment.

8. Eventueel horen van aanvrager
   Datum: 19-06-2017 (DEC-vergadering)
   Plaats: Wageningen
   Aantal aanwezige DEC-leden: 7
   Aanwezige (namens) aanvrager: Myrthe Gilbert
   Gestelde vragen *en antwoorden*
   - De centrale vraag van de DEC had betrekking op de samenhang van de typen dierproef onderling en in relatie tot de geformuleerde onderzoeksdoelen. De onderzoekster heeft dit mondeling toegelicht. De vragen van de DEC zijn vervolgens schriftelijk aan haar voorgelegd (zie 9).

   Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag (zie 9)

9. Correspondentie met de aanvrager
   Datum vragen: 17-05-2017, 20-06-2017 en 17-07-2017
   Gestelde vragen:
   De DEC is niet tot een ethische beoordeling van uw aanvraag gekomen, omdat de samenhang tussen de verschillende onderdelen van het project haar niet duidelijk was en zij daarom de afweging van het doel vs. het ongerief voor de proefdieren niet kan maken. Zij verzoekt u dan ook de aanvraag opnieuw in te dienen en hierin overzichtelijker aan te geven:
   (a) wat het doel is van de verschillende typen dierproef en hoe deze onderling samenhangen, mede in relatie tot het (STW-)programma en de doelen daarvan, o.a. waar het gaat om de humane toepassing, waar u naar verwijst.
   (b) Daarnaast verzoekt ze u hierbij, voor zover mogelijk een chronologie aan te brengen en voor zover van toepassing go-no-go-momenten in te passen.
   (c) Bovendien verzoekt zij u duidelijker te beargumenteren, waarom u varkens en pluimvee onderbrengt in één project.
   De DEC verzoekt u de samenhang tevens te verduidelijken m.b.v. een grafische weergave.
   De DEC zal deze aanvraag dan opnieuw behandelen in haar vergadering van 19 juni a.s. Vooruitlopend hierop heeft zij een aantal vragen geïdentificeerd m.b.t. de ingediende documenten (niet uitputtend):
   M.b.t. de appendices:
   - De DEC verzoekt u, voor zover van toepassing a) te vermelden, op welke ondergrond de varkens worden gehuisvest, als er geen beddingmateriaal wordt verstrekt en b) hoe het klimaat wordt verzorgd voor de varkens die zonder bedding individueel worden gehuisvest (en dus geen warmte bij elkaar of van bedding kunnen zoeken).
   - Bovendien verzoekt ze u bij appendix 3 voor de volledigheid toe te voegen, dat het hoge percentage (25%), waarvoor u verwacht dat de humane eindpunten worden bereikt vooral een gevolg is van (technische) problemen m.b.t. de bruikbaarheid van de canule en dus niet van onacceptabel ongerief.
   - Tot slot verzoekt ze u aan te geven, hoe de rectale mestmonsters worden genomen, hoe de manuele stimulering plaatsvindt (met het oog op mogelijk ongerief).

   Datum antwoord: 16-06-2017 (hernieuwde aanvraag t.b.v. DEC)
   Gestelde vragen DEC 19-06-2017:
   De DEC is nog niet tot een ethische beoordeling van uw aanvraag gekomen, omdat de samenhang tussen de verschillende onderdelen van het project haar nog niet duidelijk was en zij daarom de afweging van het doel vs. het ongerief voor de proefdieren niet kan maken. Zij verzoekt u dan ook de aanvraag opnieuw in te dienen en hierin de opmerkingen en suggesties te verwerken, die tijdens een mondeling overleg met u zijn besproken.
   Samengevat gaat het om de volgende opmerkingen:
   (a) De DEC verzoekt u in het projectvoorstel de relevantie van diverse typen dierproeven scherper te verwoorden met het oog op het beantwoorden van (een deel van) de geformuleerde hoofdvragen van het project (m.n. appendix 2 t.a.v. sanitary conditions en appendix 7, o.a. welke rol vitamines en mineralen hierin spelen); Zij verzoekt u dit tevens in de betreffende appendix (in de inleiding) uitgebreider te verwoorden;
   (b) De DEC verzoekt u de grafische weergave, die u hebt toegevoegd ook inhoudelijk in te vullen, aangezien het nog steeds niet duidelijk is, hoe

de verschillende delen daarvan passen in het project en de appendices (daarvoor verwijst u naar de tekst, waardoor het nog steeds een zoekplaatje is: wordt er bijv. in alle typen dierpoef naar microbioom gekeken?). Tevens verzoekt zij u de chronologie van de diverse delen en de onderlinge afhankelijkheid ervan duidelijker weer te geven (bijv. app. 4 en 7).
(c) Daarnaast verzoekt ze u in het projectplan voor zover van toepassing go-no-go-momenten in te passen.
(d) Tevens verzoekt ze u ook aan te geven, hoe u uit de veelheid aan correlaties die u m.b.v. metabolomics vindt de relevante correlaties selecteert.
(e) Bovendien verzoekt ze u de keuze voor de verschillende voercomponenten uitgebreider te onderbouwen (waarom richt u zich op eiwitten en vezels en niet op andere nutritionele oplossingen bijv. vetten/ koolhydraten?).
Daarnaast verzoekt ze u de vragen m.b.t. de appendices te beantwoorden, die eerder al zijn gesteld:

- De DEC verzoekt u, voor zover van toepassing a) te vermelden, op welke ondergrond de varkens worden gehuisvest, als er geen beddingmateriaal wordt verstrekt en b) hoe het klimaat wordt verzorgd voor de varkens die zonder bedding individueel worden gehuisvest (en dus geen warmte bij elkaar of van bedding kunnen zoeken).
- Bovendien verzoekt ze u bij appendix 3 en 7 voor de volledigheid toe te voegen, dat het hoge percentage (25%), waarvoor u verwacht dat de humane eindpunten worden bereikt vooral een gevolg is van (technische) problemen m.b.t. de bruikbaarheid van de canule en dus niet van onacceptabel ongerief.
- Tot slot verzoekt ze u aan te geven, hoe de rectale mestmonsters worden genomen, hoe de manuele stimulering plaatsvindt (met het oog op mogelijk ongerief).

Aanvullend hierop verzoekt de DEC u:

- bij appendix 2 de opmerking, dat de dieren antibiotica krijgen toegediend te verwijderen;
- de (gewijzigde) aantallen dieren in app. 4 en 5 consistent te vermelden;
- in app. 3 de formulering dat dieren worden behandeld met analgesie te corrigeren (analgetica).

De aanvraag is opnieuw door de plenaire DEC worden beoordeeld.
Daaruit zijn onderstaande vragen geformuleerd en op 19-07-2017 gesteld aan de onderzoeker. De *antwoorden van de onderzoeker zijn:*

- De HEP's zijn niet concreet en moeten scherper geformuleerd worden. De DEC doet de suggestie om de dieren te wegen en dit als vroeg kenmerk op te nemen.
  *Het lichaamsgewicht aan het begin van de proef meenemen voor het bepalen van een HEP heeft – behalve voor appendix 6 – geen meerwaarde omdat het om groeiende dieren gaat. In de appendices waarin lichaamsgewicht regelmatig bepaald wordt (appendix 2 – 5 en 7 voor varkens), hebben we lichaamsgewichtsverlies toegevoegd als HEP bij J2 wanneer dit nog niet vermeld was. In de appendices voor pluimvee (4, 5 en 6) was lichaamsgewichtsverlies al meegenomen als HEP.*
- In bijlage 1 zijn de aantallen dieren niet navolgbaar. Op blz. 5 wordt gesproken over 32, 22, 32 dieren. Hoe verhoudt zich dat tot 162 en 262 op blz. 6?
  *Op pagina 5 wordt inderdaad eerst gesproken over 32, 22 en 32 dieren wanneer we mestscore, ammoniakconcentratie in de mest en ammoniakconcentratie in het colon, gevonden in de literatuur, als variabele gebruiken in de power analyse. Echter, verwachten we een veel hogere variatie in de beschreven proef (waarbij we biggen uit de praktijk verzamelen) t.o.v. de variatie gerapporteerd in de literatuur onder experimentele omstandigheden. Daarom hebben we de variatie met 3 vermenigvuldigd in de poweranalyse (gebruikmakend van de concentratie ammoniak in mest en colon uit de literatuur), wat resulteerde in 166 en 262 dieren. Ik realiseer me dat dit verwarrend is, daarom heb ik de tekst in appendix 1 - A3 iets aangepast.*

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

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag..
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Licht toe waarom.

**C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De bijlagen hebben deels een samenhang en deels een overlap, maar dragen allen bij het directe en uiteindelijk doel van het project. De subdoelen die gesteld zijn, zijn deels tijdafhankelijk. De go/no-go momenten aan het einde van experiment 7 zijn verdedigbaar: het is niet zinvol om tussen experimenten een eerdere go/no-go-beslissing te nemen. Gezien de doelstelling is het logisch dat beide diersoorten (varkens, pluimvee) in de experimenten opgenomen zijn.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan (bv. Wet Dieren en Wet Natuurbescherming).
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

*Belangen en waarden*

4. Het directe doel is het in kaart brengen van de complexe relatie tussen voereiwit, micro-organismen en eiwitfermentatiemetabolieten en het effect daarvan op darmgezondheid en groei van varkens en pluimvee.
   Het uiteindelijke doel is een efficiënter gebruik van eiwitbronnen waardoor:
   - de darmgezondheid in varkens en pluimvee verbetert
   - antibioticagebruik vermindert
   - inzicht ontstaat in de werkingsmechanisme die model kunnen staan voor andere diersoorten en de mens
5. De belanghebbenden in het project en hun morele waarden zijn:
   - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit. De meeste proefdieren zullen licht ongerief ondervinden. Voor de dieren die geopereerd worden is het ongerief matig.
   - Doeldieren: met name de dieren in de conventionele veehouderij zullen een belang hebben bij een verbeterde gezondheid/welzijn. De dieren in de extensieve veehouderij vallen buiten de scoop van dit project, hoewel een optimale benutting ook voor deze laatste groep dieren van belang is.
   - Veehouder: economisch belang door een verbeterde gezondheid en voederconversie en een lager antibioticagebruik.
   - Onderzoeker/CRO: economisch belang, wetenschappelijk belang.
   - Voerfabrikant: economische belang. Door de grote markt voor additieven kan dit een redelijk groot belang zijn.
   - Milieu/maatschappij: Een lager antibioticagebruik kan tot minder antibioticaresistentie leiden. De DEC acht dit, in dit project, een gering belang.
   - Mens: gezondheidsbelang, enerzijds door een lagere antibioticaresistentie, anderzijds door het translationele aspect van het onderzoek.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. Er is veel aandacht besteed aan de opzet per experiment en een logische volgorde in de experimenten. Figuur 1 in de projectbeschrijving geeft een duidelijk overzicht van de samenhang van de experimenten in het project. De uitleesparameters richten zich met name op darmgezondheid. De aantallen dieren zijn per experiment statistisch en op basis van literatuur onderbouwd. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in

de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.

*Welzijn dieren*

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheid op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
   ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden soms op roosters met rubbermatten of op een tenderfootbodem gehuisvest. Dieren die voorzien zijn van een canule worden individueel gehuisvest. De onderbouwing hiervoor is valide in de ogen van de DEC.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" resp. "matig" voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: monstername, eventueel optreden van diarree, inzetten en hebben van een darmcanule en/of bloedvatkatheter, euthanasie en individuele huisvesting.
12. Naast ongerief is er voor de meeste dieren geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. Voor de gecanuleerde/gekatheteriseerde dieren is wel sprake van integriteitsaantasting. Dit is te rechtvaardigen omdat dit leidt tot zuiverder resultaten en minder ongerief voor de dieren.
13. De DEC heeft vastgesteld dat, na aanpassing door de onderzoeker, de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

*3 V's*

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De complexe relatie tussen voereiwit en fermenteerbare vezels versus microben en darmwand kan nog niet in vitro bestudeerd worden.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. Daar waar gevraagd wordt om 1 sekse is dit helder onderbouwd. De andere sekse wordt niet geëuthanaseerd maar ingezet in de reguliere mesterij. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Er is geen sprake van surplusdieren.
19. Een deel van de dieren wordt gedood in het kader van het project om met name darmmateriaal te kunnen onderzoeken. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Dieren die niet gedood worden in het kader van het onderzoek worden afgemest conform de praktijk.

*NTS*

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

## D. Ethische afweging

*D. Ethische afweging*

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt onderzoek naar de relatie tussen voereiwit, micro-organismen en eiwitfermentatie en het effect daarvan op de darmgezondheid van varkens en pluimvee het gering tot matig ongerief dat 3232 varkens en 884 kippen ondervinden tijdens dit onderzoek?

2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. In haar afweging heeft de DEC meegewogen dat dit project leidt tot meer inzicht in de relatie voereiwit/micro-organisme/eiwitfermentatie. Dit draagt bij aan de waarde van kennis. De DEC waardeert dit als een reëel belang. Wanneer het project zijn uiteindelijke doel bereikt, zal de kennis die verkregen kan worden, een bijdrage leveren aan een betere gezondheid en welzijn van dieren in de praktijk. De DEC waardeert deze waarden van gezondheid en welzijn als substantiële waarden. Hierbij geldt echter de kanttekening dat de DEC de bijdrage van deze kennis aan deze waarden heeft beoordeeld in het licht van de relatieve meerwaarde van dit onderzoek de opzichte van andere maatregelen ter bevordering van het dierenwelzijn. Op basis hiervan ziet de DEC dit als een reëel belang.
   De economische belangen voor de veehouder, CRO/onderzoeker en industrie schat de DEC in als beperkt. Daarnaast kan het project bijdragen aan de waarde van volksgezondheid aangezien het een bijdrage kan leveren aan de reductie van antibioticagebruik. Gezien de relatief beperkte bijdrage van de gegevens van dit onderzoek op dit punt waardeert de DEC dit als een beperkt belang.
   Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. De aantasting van de waarden van de proefdieren als gevolg van de handelingen binnen het project is voor het grootste deel van de dieren gering. Een klein deel van de dieren heeft een matige aantasting.
3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar de relatie tussen voereiwit, micro-organismen en eiwitfermentatiemetabolieten en het effect daarvan op darmgezondheid en groei van varkens en pluimvee met maximaal matigongerief voor maximaal 3232 varkens en 884 kippen. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.
   De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

**E. Advies**

1. Advies aan de CCD:
   - De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaande knelpunt is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
   - De DEC is zich terdege bewust van de gevolgen die de huidige intensieve veehouderij met zich meebrengt en zij neemt dat mee in haar ethische afweging. De DEC is van mening dat het welzijn van de dieren in de intensieve veehouderij onder druk staat en dat onderzoek een bijdrage moet leveren aan het verbeteren van de leefomstandigheden van de dieren. In het voorliggende project is voor de DEC voldoende aanwijzing dat de kennis gebruikt kan en zal worden om het welzijn (inclusief gezondheid) van dieren te verbeteren. Bovendien heeft kennis van een optimale benutting ook meerwaarde voor dieren in de extensieve veehouderij. De DEC ziet dit projecten juist als een stap naar mogelijke verbetering binnen de huidige veehouderij. De discussie over de wenselijkheid van die veehouderij-omstandigheden zal in een ander gremium dan de DEC gevoerd moeten worden.

Met vriendelijke groet,

ing. I.E. Leushuis-Kappers
secretaris DEC WUR

14.

**Form**
**Project proposal**

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

# 1 General information

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University |
| 1.3 | Provide the title of the project. | To determine the relation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry |

# 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 of routine production
[] Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
[] Research aimed at preserving the species subjected to procedures

[] Higher education or training
[] Forensic enquiries
[] Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

# 3 General description of the project

**3.1 Background**

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

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

A partnership program was set up between [redacted] The objective, formulated in this program, was to increase our understanding of the relation between dietary protein, protein fermentation, and gut health, to improve gut health and reduce digestive disorders in pigs and poultry. The research proposals finally granted (5 PhD students and 1 Post-doctoral researcher) were developed independently. Some overlap between these proposals was noted by [redacted]. Together it was decided to form a consortium with the university partners, [redacted]. The consortium aims to answer the questions posed in the individual proposals. Furthermore, animal experiments with overlap were combined between the granted projects, which has resulted in a reduction in the number of experimental animals within the consortium. Within the consortium, the coherent experiments contributing to the same objective were combined to form one large project. Across these coherent experiments, metabolomics and microbiomics analyses will be conducted, with the objective to elucidate the general mechanisms underlying compromised gut health. This has led to the current application, which contains seven studies to be performed within the framework of the consortium. In a later stage, another application may follow to address the remaining questions. These remaining questions depend on the outcome of the experiments described in this application, and follow-up studies are, therefore, out of scope for this application. Go-no-go decisions will follow after these initial 7 studies. The integrated metabolomics approach allows us to generate hypotheses for the follow-up studies and with bioinformatic approaches we will prioritize the relevant correlations to be studied in the follow-up experiments.

**Background**

Compromised gut health and related intestinal disorders (i.e. diarrhea) are a large problem in pig and poultry production systems. For example, diarrhea in piglets in the post-weaning period (i.e. post-weaning diarrhea, PWD) and wet litter (WL) in broiler houses are often reported causes of increased mortality and impaired health, welfare, and performance (Madec et al., 1998; Hermans et al., 2006; de Jong et al., 2014; Dunlop et al.,

2016). In pig and poultry production, antibiotic treatments to (partially) overcome these gut health problems are often applied. With the societal pressure to reduce therapeutic use of antibiotics - to minimize the risk of microbial resistance against antibiotics - controlling gut health becomes even more important in pig and poultry production.
Although, PWD and WL are multifactorial problems, dietary factors play an important role in their onset (Madec et al., 1998; Hermans et al., 2006; Dunlop et al., 2016). Particularly, high protein levels have been associated with increased risk for PWD (Heo et al., 2008, 2009, 2015) or WL (Bench et al., 2016). The underlying mechanisms by which dietary protein causes intestinal problems remain, however, largely unknown. Protein fermentation in the hindgut is believed to be (partially) responsible for negative effects of dietary proteins on gut health. The ileal digestion of dietary protein differs between protein sources and levels (Heo et al., 2010; Salgado et al., 2002), which affects the flow of protein into the large intestine of pigs and poultry. In addition, endogenous secretions (such as mucus, enzymes and shed epithelial cells) contribute to the flow of proteins into the large intestine. In the hindgut, these proteins can be fermented by saccharo-proteolytic bacteria (such as Clostridia, Proteus and E. coli) resulting in the proliferation of these bacteria, some of which are known pathogens. In addition, proteins have a buffering capacity in the gut, which favors proliferation of pH-sensitive bacteria, which often include pathogens. Furthermore, the negative relation between protein fermentation and gut health may be caused by protein fermentation metabolites, such as branched-chain fatty acids, ammonia, phenolic and indolic compounds, hydrogen sulfide, biogenic amines and nitric oxide and N-nitroso compounds. Some of these protein fermentation metabolites have potential damaging effects on gut function, but these conclusions mainly rely on tests in *in vitro* systems (Lin and Visek, 1991; Hughes et al., 2008; Andriamihaja et al., 2015 Beaumont et al., 2016; Leschelle et al., 2005) and often contradictory results were reported. Such protein fermentation metabolites are produced in pigs and poultry as well, especially when feeding diets containing high protein content or a low digestible protein source (Bikker et al., 2006; Heo et al., 2010; Pieper et al., 2012, 2014; Qaisrani et al., 2014). A causative relation between protein fermentation metabolites and gut health, can however not be deduced from these studies and the available information does not suffice for the development of nutritional interventions to improve gut health. In order to develop nutritional solutions that aim to improve gut health in pigs and poultry, the relation between dietary protein and microbiota, protein fermentation metabolites, and gut health, needs to be studied in more detail.

One potential nutritional solution for reducing (detrimental effects of) protein fermentation (metabolites) is the inclusion of fermentable fiber. The ratio between protein and fermentable fiber plays an essential role in the dynamics of protein fermentation (Le Gall et al., 2007) and some studies have reported a reduction in the intestinal concentration of protein fermentation end-products, such as ammonia, amines and phenolic compounds, in pigs fed increased levels of fermentable fiber (Bikker et al., 2006; Pieper et al., 2012, 2014). To identify potential fiber sources that can be included in such nutritional solutions, the interaction between various fiber types and protein fermentation is studied in this project.

Environmental conditions can affect the animals' microbiota composition. It has been consistently demonstrated that pigs kept under low sanitary conditions (resulting in a lower sub-clinical health status of the herd) have a reduced nitrogen digestibility compared with pigs kept under high sanitary conditions (Kampman-van der Hoek et al., 2016; van der Meer et al., 2016). This effect is likely mediated through the microbiome. It illustrates that steering of protein fermentation in the gut is dependent on the (environmental, sanitary) status under which the pigs are kept. It is, therefore, of importance to evaluate the interactive effects of sanitary status (as a model for pig farms with a reduced health status) and dietary protein content on protein fermentation (metabolites), gut health and performance in pigs.

**References**

Andriamihaja M, Lan A, Beaumont M, Audebert M, Wong X, Yamada K, Yin Y, Tomé D, Carrasco-Pozo C, et al. The deleterious metabolic and genotoxic effects of the bacterial metabolite p-cresol on colonic epithelial cells. Free Radic Biol Med. 2015;85:219-27.
Beaumont M, Andriamihaja M, Lan A, Khodorova N, Audebert M, Blouin J, Grauso M, Lancha L, Benetti P, et al. Detrimental effects for colonocytes of an increased exposure to luminal hydrogen sulfide: The adaptive response. Free Radic Biol Med. 2016;93:155-64.
Bench C, Oryschak M, Korver DR, Beltranena E. Behaviour, growth performance, foot pad quality, bone density and carcass traits of broiler chickens reared with barrier perches and fed different dietary crude protein levels. Can J Anim Sci.2016;10.1139/CJAS-2015-0202.
Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, le Huërou-Luron I, Lallés JP, Awati A. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets. J Anim Sci. 2006;84:3337-45.
Dunlop MW, Moss AF, Groves PJ, Wilkinson SJ, Stuetz RM, Selle PH. The multidimensional causal factors of 'wet litter' in chicken-meat production. Sci Total Environ. 2016;562:766-776.
Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ Pluske JR. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. Arch Anim Nutr. 2008;62:343-358.
Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ Pluske JR. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. J Anim Sci. 2009;87:2833-2843.
Heo JM, Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Hampson DJ, Pluske JR. Feeding a diet with a decreased protein content reduces both nitrogen content in the gastrointestinal tract and post-weaning diarrhoea, but does not affect apparent nitrogen digestibility in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim Feed Sci Technol. 2010;160:148-59.
Heo JM, Kim JC, Yoo J, Pluske JR. A between-experiment analysis of relationships linking dietary protein intake and post-weaning diarrhea in weanling pigs under conditions of experimental infection with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim. Sci. J. 2015;86:286-293.

Hermans PG, Fradkin D, Muchnik IB, Organ KL. Prevalence of wet litter and the associated risk factors in broiler flocks in the United Kingdom. Vet Rec. 2006;158:615-622.
Hughes R, Kurth MJ, McGilligan V, McGlynn H, Rowland I. Effect of colonic bacterial metabolites on Caco-2 cell paracellular permeability in vitro. Nutr Cancer. 2008;60:259-66. de Jong IC, Gunnink H, van Harn J. Wet litter not only induces footpad dermatitis but also reduces overall welfare, technical performance, and carcass yield in broiler chickens. J Appl Poult Res. 2014;23:51-8.
Kampman-van der Hoek E, Jansman AJM, van den Borne JJGC, van der Peet-Schwering CMC, van Beers-Scheurs H, Gerrits WJJ. Dietary Amino Acid Deficiency Reduces the Utilization of Amino Acids for Growth in Growing Pigs after a Period of Poor Health. J Nutr. 2016;146:51-58.
Le Gall M, Quillien L, Seve B, Guéguen J, Lalles JP. Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (L.) lectin and pea albumin 2. JAS. 2007; 85:2972-2981.
Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottière HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso M, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, et al. Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. Biochim Biophys Acta. 2005;1725:201-12.
Lin HC, Visek WJ. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. J Nutr. 1991;121:887-93.
Madec, F, Bridoux N, Bounaix, S, Jestin, A. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. Prev Vet Med. 1998;16:53-72.

van der Meer Y, Lammers A, Jansman AJM, Rijnen MMJA, Hendriks WH, Gerrits WJJ. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. J Anim Sci. 2016;94:4704-4719.
Pieper R, Boudry C, Bindelle J, Vahjen W, Zentek J. Interaction between dietary protein content and the source of carbohydrates along the gastrointestinal tract of weaned piglets. Arch Anim Nutr. 2014;68:263-80.
Pieper R, Kröger S, Richter JF, Wang J, Martin L, Bindelle J, Htoo JK, von Smolinski D, Vahjen W, et al. Fermentable fiber ameliorates fermentable protein-induced changes in microbial ecology, but not the mucosal response, in the colon of piglets. J Nutr. 2012;142:661-7.
Qaisrani SN, Moquet PCA, van Krimpen MM, Kwakkel RP, Verstegen MWA, Hendriks WH. Protein source and dietary structure influence growth performance, gut morphology, and hindgut fermentation characteristics in broilers. Poultry Sci. 2014;93:3053-64.
Salgado P, Freire JPB, Mourato M, Cabral F, Toullec R, Lallès JP. Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes. Livest Prod Sci. 2002;74:191-202.

**3.2 Purpose**

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

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

The main objective of the consortium is to investigate the relation between dietary protein and microbiota, protein fermentation metabolites, and their effect on gut health and performance of pigs and poultry. We aim to reach this objective through a series of *in vitro* and *in vivo* pig and poultry studies (described in 3.4). The specific key research questions to be studied are:

1. How are dietary proteins, microbiota, and protein fermentation (metabolites) related to intestinal health and PWD in piglets?
2. How do sanitary conditions affect the relation between dietary proteins, digestion, protein fermentation (metabolites) and performance in pigs?
3. How are dietary proteins, microbiota, and protein fermentation (metabolites) related to intestinal health and WL in broilers?
4. What (dietary) interventions can reduce or remove harmful metabolites/microbial species in the gut thereby increasing gut health in pigs and poultry?
5. Are protein fermentation metabolites transferred from broiler breeders to their eggs and is there a relation between protein fermentation in broiler breeders and intestinal function of their offspring?
6. Is there a relation between protein source, microbiota, protein fermentation, and uremic toxin production in piglets?

We expect to reach our main project's objective, because the scientific partners have extensive expertise in the research areas (i.e. animal nutrition, microbiology, host physiology/metabolism and metabolomics tools) required within this project. The industrial partner is a global leader in additives for animal feed, and a direct stakeholder for the utilization of newly gained knowledge.

**3.3 Relevance**

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

This project will provide insight in causal relations between protein fermentation, its end-products and gut health of pigs and poultry. This knowledge can be applied to develop nutritional solutions to prevent gut health problems and optimize gut function, which will contribute to an increase in overall animal health, thereby improving animal welfare and reducing the need for therapeutic use of antibiotics. Increased understanding of the relations between protein fermentation (end-products) and gut health in pigs and poultry might also lead to hypotheses relevant for other species, including humans, where protein fermentation contributes to diarrhea in patients with renal disease.

**3.4 Research Strategy**

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

The central problem to be tackled is compromised gut health in pigs and poultry, leading to digestive disorders as PWD and WL. Gut health is a multifactorial concept, depending on intrinsic factors of the individual and extrinsic factors, such as diet (e.g. protein and fiber contents) and environment (e.g. sanitary status). Protein fermentation is believed to play an important role in gut health, and understanding its mode of action is pivotal to the development of nutritional solutions. There are various ways to steer protein fermentation, e.g. by the choice of the dietary protein sources and their inclusion level, or by the choice of dietary fiber sources and their inclusion level. It is proposed that many deleterious effects commonly attributed to protein fermentation are mediated through the metabolome, and to a lesser extent microbiome. The seven studies included in this project all investigate the relation between dietary protein/protein fermentation and gut health, but each study has its own focus. An overview of the seven appendices of this application is provided in figure 1.

We will use untargeted and targeted metabolite platforms, with which we can establish the difference in metabolites in different parts of the intestinal lumen, blood, intestine and liver tissue as influenced by ileal undigested protein. The novelty of this project is the application of untargeted metabolomics across samples and species to establish associations between (unknown) metabolites and gut health. In subsequent research, causal relationships between protein fermentation and gut health can be established. It is of importance to perform this research with both pigs and poultry, because their digestive physiology differs substantially, likely resulting in differences between species in the relation between dietary protein, protein fermentation, and gut health. Ileal digestibility of protein is lower in poultry than in pigs, resulting in a larger and different fraction of proteins that enters the large intestine. Furthermore, only soluble (or solubilized) proteins will be fermented in chickens. Hence, the type of proteins to be studied, and the potential fermentation metabolites to be formed, will differ between pigs and poultry. However, there is also overlap in the microbial species present in gut of pigs and poultry and in the metabolites produced following protein fermentation. Mechanisms by which these common metabolites affect the gut epithelium might be similar across species. Therefore, in this consortium, metabolomics and microbiomics data from all animal experiments are combined to elucidate common mechanisms by which metabolites affect gut health.

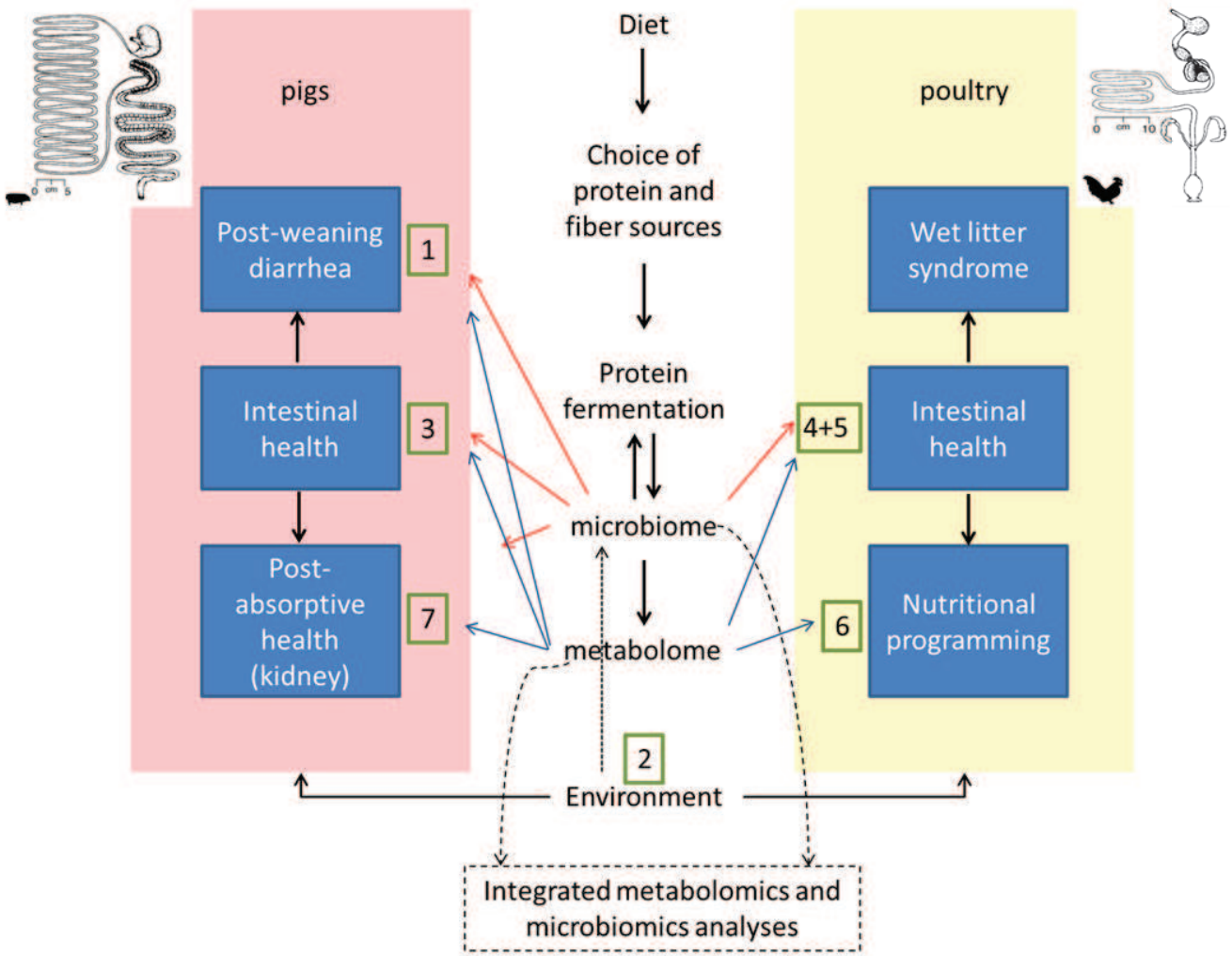



**Figure 1.** Overview of the research strategy. Green boxes indicate the main focus of the individual experiments, where the numbers correspond with appendix numbers. The red arrows indicate the appendices in which microbiome measurements are included and the blue arrows indicate the appendices in which metabolomics analyses are included. The metabolomics and microbiomics data will be integrated using bioinformatics tools. Appendix 1 is required to answer research question 1. Appendix 2 is required to answer research question 2. Appendix 3 and 5 are required to answer research question 4. Appendix 4 is required to answer research question 3. Appendix 6 is required to answer research question 5. Appendix 7 is required to answer research question 6.

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.

Seven appendices are included in this CCD-application to answer the research questions as described in paragraph 3.2. These seven appendices are the first coherent experiments originating from one of three sub-projects described below.

Sub-project 1: [redacted]
This sub-project targets the relation between protein fermentation, gut function, and PWD, with the aim to reduce PWD in piglets. The first experiment in this sub-project is a large-scale on-farm piglet study (appendix 1 "On-farm piglet experiment") to determine associations between PWD, protein fermentation metabolites, and functional gut parameters in order to answer research question 1. Based on the associations established in this on-farm experiment, *in vitro* studies will be performed to assess effects of identified metabolites and fecal water extracts (from piglets from the on-farm study) on gut function, using pig intestinal organoids. These organoids can be formed from isolated crypts of the intestine, and represent an almost complete functional derivate of the actual gut. Hence, many relevant gut functions can be modelled *in vitro* in an unprecedented way. In the last phase of this sub-project, a second *in vivo* piglet experiment is anticipated. The design of this experiment will be based on the outcome of the "on-farm piglet experiment" (appendix 1) and *in vitro* experiments and is out of scope for this CCD project application.

Sub-project 2: [redacted]
This sub-project aims to study the effects of indigestible dietary proteins on microbial activity, proteolytic fermentation, intestinal health, and performance of pigs and broilers.
In the first experiment (appendix 2 "Digestibility experiment with piglets") the effect of indigestible dietary protein levels on nutrient digestion, metabolite profile, and piglet performance and the interaction with sanitary conditions are studied in order to answer research question 2. Good and sub-optimal sanitary conditions are applied to generate a health disturbance similar as in practice, resulting in differences in sub-clinical health. In a second pig experiment the (interactive) effects of dietary fermentable fibers and indigestible protein on the extent of fermentation, fermentation end-products, microbial colonization, digesta passage rate, and feces quality will be studied (appendix 3 "Digestibility experiment with cannulated pigs") in order to answer research question 4.
The first broiler experiment in this sub-project (appendix 4 "Digestibility experiment with broilers") aims to determine the contribution of different protein sources and levels to hind gut protein fermentation in broilers and determine its effects on gut health, protein fermentation metabolites and performance in order to answer research question 3. A second experiment with broilers will be performed (see appendix 5 "Experiment with broilers to evaluate feed strategies to reduce protein fermentation") to evaluate feed strategies that can potentially reduce protein fermentation (metabolites) and improve gut health of broilers in order to answer research question 3.
A second objective of this sub-project is to study transgenerational effects in poultry. A large body of evidence links maternal/fetal (mal)nutrition to the development of diseases after birth (in rodents and human; Godfrey et al., 2000, Hansen et al., 2014, Paul et al., 2016). In poultry, it is known

that dietary protein fed to broiler breeders can affect broiler offspring performance (Rao et al., 2009). When low quality protein sources are fed to broiler breeders, an increase in ileal undigested protein can increase the production of (toxic) protein fermentation metabolites. To date, it is not known whether these metabolites are also transferred to the eggs and, subsequently, can affect broiler offspring gut health and performance. In the experiment described in appendix 6 ("Effects of dietary protein on metabolite profiles in serum and eggs of broiler breeders"), transgenerational effects of dietary protein in poultry will be studied in order to answer research question 5. Broiler breeders will be fed different diets to create a contrast in cecal protein fermentation and (serum) metabolite profiles will be determined. The transfer of metabolites to eggs and offspring will be measured, as well as effects on broiler offspring.
Follow-up experiments in this sub-project include *in vitro* broiler organoid studies to elucidate underlying mechanisms causing compromised gut health, based on the results and metabolites identified in the previous experiments. Subsequently, follow-up experiments aimed at (dietary) interventions to increase gut health in pigs and poultry are anticipated. The design of these experiments will depend on the outcome of the initial experiments, and are out of scope for this CCD project application.

Sub-project 3: [redacted]

A negative association between protein fermentation and health has also been proposed in humans. In renal transplants, some of the organic acids produced during fermentation of proteins, the uremic toxins (i.e. p-cresol sulfate and indoxyl sulfate), are well-known to contribute to the so-called uremic syndrome. This syndrome is associated with malaise, poor appetite, intestinal complaints, wasting, tendency for malnutrition, sarcopenia and systemic low-grade inflammation in patients with advanced renal disease. Young piglets may be particularly susceptible to the toxic effects of this group of metabolites of protein fermentation, because their immune system, gut and renal function – necessary for removal of these toxic organic acids – is still immature and impaired compared to the adult situation.
In this sub-project, knowledge from observational cohort studies in human renal transplant patients on the relation between dietary protein, gut microbiota, protein fermentation, and uremic toxin production and how these are affected by dietary interventions, will be used to gain insight in the relation between protein fermentation (metabolites) and gut health in piglets. Vice versa, using piglets as a model, mechanistic understanding of the deleterious effects of protein fermentation can be achieved that is important for these patients.
A combination of *in vitro* and *in vivo* approaches will be used to gain insight into how different protein sources (e.g. mucus, indigestible sulphur containing feed proteins) affect gut microbiota, large intestinal protein fermentation, and uremic toxin production. The experiment described in appendix 7 ("Uremic toxin production during the in *vitro* fermentation of proteins in ileal digesta of pigs") is aimed at establishing predictive relations between the (amino acid) composition of ileal undigested proteins and the formation of uremic toxins during their subsequent fermentation *in vitro* in order to answer research question 6.
The availability of minerals (ca and mg) and vitamins (riboflavin, pantothenic acid, vitamin C) have been proven influential in the health of renal transplants. Follow-up experiments in this sub-project could, therefore, include vitamins or mineral supplementation as a nutritional strategy to reduce harmful effects of protein fermentation metabolites on post-absorptive health. The design of such a follow-up experiment will be based on the outcomes of appendix 7 and is, therefore, out of scope for this CCD project application.

**References**

Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. Am J Clin Nutr. 2000;71:1344S-1352S.
Hansen CHF, Krych Ł, Buschard K, Metzdorff SB, Nellemann C, Hansen LH, Nielsen DS, Frøkiær H, Skov S, Hansen AK. A maternal gluten-free diet reduces inflammation and diabetes incidence in the offspring of NOD mice. Diabetes 2014; 63:2821-2832.
Paul HA, Bomhof MR, Vogel HJ, Reimer RA. Diet-induced changes in maternal gut microbiota and metabolomic profiles influence programming of offspring obesity risk in rats. Sci Rep. 2016;6:20683.
Rao K, Xie J, Yang X, Chen L, Grossmann R, Zhao R. Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. Br J Nutr. 2009;102:848-857.

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 sub-projects are conducted in parallel and there will be strong collaboration and cross-utilization of expertise and knowledge among the sub-projects within this consortium. The first experimental activities planned and the selection points are schematically presented in figure 2. Based on the outcome of previous experiments, experiments will be adapted if necessary (both within and between sub-projects).
Important selection points in this project include:

- Appendix 1: before the start of the experiment described in appendix 1, a pilot study will be conducted to determine/validate quick selection criteria for post-weaning diarrhea in piglets.
- Appendix 3: the selection of protein sources will depend on the data obtained in appendix 7.
- Appendix 4: dietary treatments in the experiment described in appendix 4 will be determined on in vitro digestion tests.
- Appendix 5: protein sources included in the diets described in appendix 5 will be selected based on the outcome of the experiment described in appendix 4 (both in vitro and in vivo experiment).
- Appendix 6: selection of dietary treatments for broiler breeders will be based on the outcome of the in vitro and in vivo experiment described in appendix 4.
- Appendix 7: selection of the protein sources to be included in the diets will be based on the in vitro work described in appendix 4.

In all sub-projects, (selected) samples of piglets and broilers will be used for metabolomics analyses. In this way, a library of metabolites will be accomplished for piglets and broilers. A milestone in this project will be the identification of metabolic fingerprints related to protein fermentation or impaired gut health in pigs and broilers. The integrated metabolomics and microbiomics approach across all studies allows us to generate hypotheses for the follow-up studies.

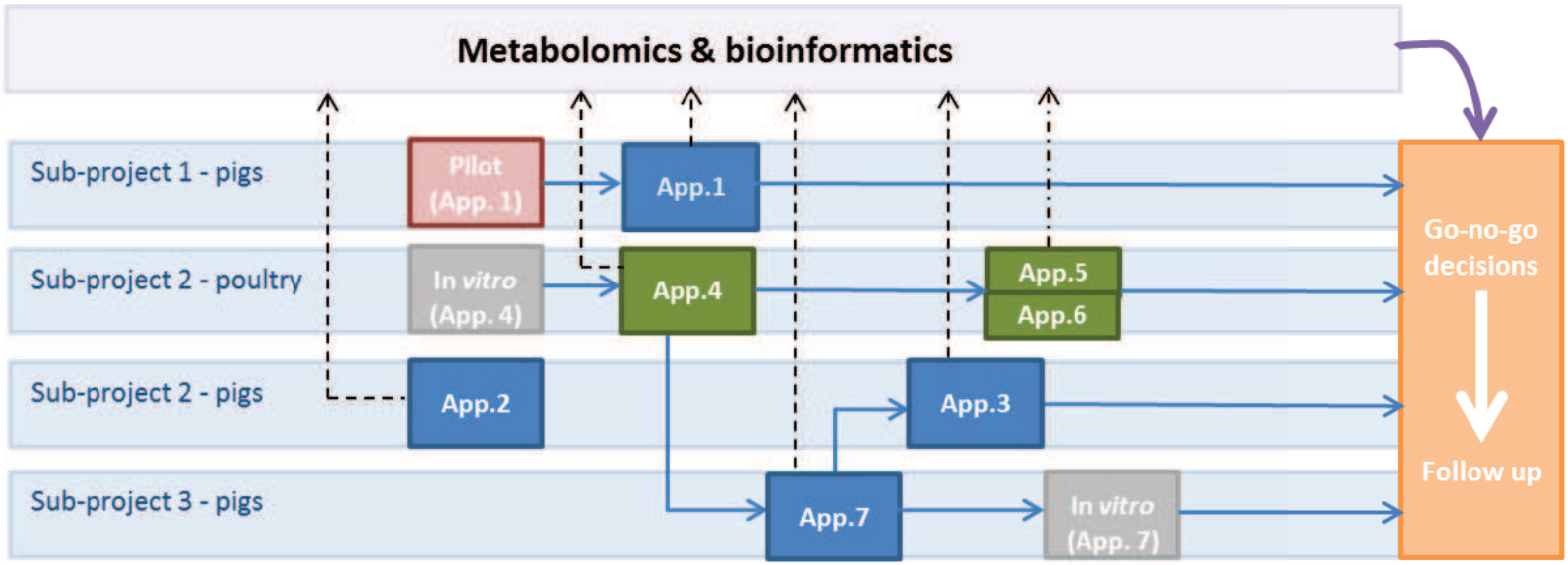



**Figure 2.** Overview of planned activities and selection points in the sub-projects. Boxes indicate individual experiments (red=pilot, blue= *in vivo* pig, grey=*in vitro*, green= *in vivo* broiler) or follow-up activities (orange). App. indicates the appendix in which the experimental procedures have been described. Blue arrows indicate selection points. Black arrows with dashed lines represent the flow of inputs for the integrated metabolomics approach by using bioinformatics tools.

The aim of the pilot (app. 1) is to determine inclusion criteria for post-weaning diarrhea in piglets kept under commercial conditions. The aim of app. 1 is to determine associations between post-weaning diarrhea, protein fermentation metabolites and gut function indices in piglets kept under commercial conditions.
App. 2 aims to evaluate the interactive effects of sanitary status (as a model for pig farms with a reduced health status) and dietary protein content on protein fermentation (metabolites), gut health and performance in pigs. The aim of app. 3 is to test the potential of fermentable fiber for reducing (detrimental effects of) protein fermentation (metabolites) in pigs.
The aim of the in vitro work (app. 4) is to screen protein sources on their potential ileal digestion and hind gut fermentation in order to select protein sources for in vivo experiments. The aim of app. 4 is to determine the contribution of different protein sources and levels to hind gut protein fermentation in broilers and determine its effects on gut health and performance. Appendix 5 aims to determine if potential nutritional strategies, such as including fermentable fiber and providing a coarse diet structure, can affect protein fermentation (metabolites) and improve gut health of broilers. The aim of app. 6 is to determine if protein fermentation metabolites are transferred from broiler breeders to their eggs and can affect broiler offspring intestinal function.
Appendix 7 aims to establish predictive relations between the (amino acid) composition of ileal undigested proteins in pigs and the formation of uremic toxins (a specific group of protein fermentation metabolites) during their subsequent fermentation in vitro (in vitro – app. 7).

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 | On-farm piglet experiment |
| 2 | Digestibility experiment with piglets |
| 3 | Digestibility experiment with cannulated pigs |
| 4 | Digestibility experiment with broilers |
| 5 | Experiment with broilers to evaluate feed strategies to reduce protein fermentation |
| 6 | Transgenerational effects of protein fermentation metabolites in poultry |
| 7 | Uremic toxin production during the in vitro fermentation of proteins in ileal digesta of pigs |

15.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>1 | Type of animal procedure<br>On-farm piglet experiment |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The role of protein fermentation in the occurrence of post-weaning diarrhea (PWD) is poorly understood. The relation between dietary protein and PWD has been studied under highly controlled conditions, but then often diarrhea does not occur (Htoo et al., 2007; Nyachoti et al., 2006). It is, therefore, of importance to study PWD under practical conditions. The aim of this experiment is to determine associations between PWD, protein fermentation metabolites and gut function indices in piglets kept under commercial conditions.

**General design**

In this experiment, piglets will be selected and sampled from commercial farms. In collaboration with and advised by veterinarians, multiple farms will be selected. Farms will be classified based on known parameters (such as average daily gain, feed efficiency, mortality, known occurrence of outbreaks PWD). At each farm, piglets with and without PWD are selected and dissected for sample collection. In total, 200 piglets will be sampled, including healthy control piglets selected on each farm.

First, piglets are identified based on clinical signs of diarrhea (or non-diarrhea for the controls). Secondly, a rectal fecal sample is collected and scored on fecal consistency. The inclusion criteria (such as fecal pH, ammonia concentration) for piglets with PWD will be determined in a pilot study (see below, A – paragraph 3). Based on these developed criteria, piglets are classified as PWD and non-PWD (controls) and, lastly, are blood-sampled and killed for sample collection. Blood-sampling is performed before killing because the method of killing might affect the (protein fermentation) metabolite profile in the blood. Collected samples at dissection include digesta, urine and intestinal tissues.

Recently, Dou et al. (2017) showed that pre-weaning microbiota diversity and composition could be related to PWD under experimental conditions. In this experiment, fecal samples will, therefore, be collected at two additional time points before dissection, in which microbiota/pathogen analyses are conducted. This will enable the investigation of causal relations between microbial composition and/or pathogens and PWD.

Differences between farms in feed composition can occur, but are generally small in Dutch piglet farming. Feed-specific data will be recorded at each farm and will be part of the farm effect in the data analysis.

**Primary outcome parameters**

First, analyses will be conducted in samples from all 200 piglets to quantify protein fermentation, using known protein fermentation products (e.g. *p*-cresol). Based on these results, a sub-set will be selected to obtain a representative reflection of the variation in protein fermentation in PWD piglets. In this subset, detailed laboratory analyses will be performed. Detailed analyses include microbiota composition in digesta or fecal samples, presence of pathogens causing diarrheal disease, intestinal morphology, mucosal barrier function measures and blood inflammatory cytokines. In addition, (untargeted and targeted) metabolomics analyses will be performed in feces, digesta or blood samples. Finally, multivariate analyses are performed

to determine associations between protein fermentation, PWD, pathological/functional read-outs of gut function, microbiota parameters, metabolomics analyses and immunological measures.

**References**

Dou, S., P. Gadonna-Widehem, V. Rome, D. Hamoudi, L. Rhazi, L. Lakhal, T. Larcher, N. Bahi-Jaber, A. Pinon-Quintana, A. Guyonvarch, I. L. E. Huërou-Luron, and L. Abdennebi-Najar. 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. PLoS One 12:e0169851.

Htoo, J. K., B. A. Araiza, W. C. Sauer, M. Rademacher, Y. Zhang, M. Cervantes, and R. T. Zijlstra. 2007. Effect of dietary protein content on ileal amino acid digestibility, growth performance, and formation of microbial metabolites in ileal and cecal digesta of early-weaned pigs. J. Anim. Sci. 85:3303-3312.

Nyachoti, C. M., F. O. Omogbenigun, M. Rademacher, and G. Blank. 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. J. Anim. Sci. 84:125-134.

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

In this experiment, we are studying PWD and the variation in protein fermentation under practical circumstances. Therefore, we will exclusively focus on natural occurrence of diarrhea and will not impose (dietary) treatments. The onset of PWD occurs around 3 to 4 days after weaning (advise of pig veterinarian; Kyriakis et al., 1999; Madec et al., 1998) and can remain up to 2 weeks after weaning (Kyriakis et al., 1999; Heo et al., 2008). Three to 14 days following weaning will be the window for PWD identification and subsequent dissection and sample collection at the commercial farms. Because early life microbial biomarkers could be of importance as well, fecal samples are collected in the pre-weaning period as well. In total, 3 fecal samples are collected per piglet (1 pre-weaning, 1 post-weaning and 1 for PWD identification/before dissection). It is unknown which piglets will develop diarrhea in the post-weaning period, therefore, a larger group of piglets will be sampled for feces in the pre-weaning and early post-weaning period (see also B - estimated numbers).

In this experiment, microbial composition and microbial metabolites in piglets are studied, and, therefore, individual piglets which have received antimicrobial treatments should not be included. When sows have been treated with antimicrobials, her piglets will not be included. In general, few group antimicrobial treatments are applied to piglets in the pre-weaning period. Pre-weaned piglets which have been treated individually will not be included in this study. In the post-weaning period, antimicrobial treatments (for PWD) should be withheld in the period of sample collection in the departments from which piglets will be selected. In case of diseased piglets (other than diarrhea), there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. For instance, if individual piglets should be treated for joint infections, these piglets will not be included in the experiment. Selection of piglets will be based on clinical signs of PWD and a (rectal) fecal sample is obtained to verify diarrhea or non-diarrhea. The piglets will be carefully handled. If a piglet does not defecate during handling, the fecal sample is collected via manual stimulation. One person holds the piglet and a second person puts on a glove (new glove for each piglet), adds water on his/her little finger, carefully enters the anus and gently stimulates the rectal ceiling (max. of 2 minutes) to stimulate defecation. A maximum of 3 attempts is used per piglet per day in order to obtain a rectal fecal sample from a piglet. Based on the fecal samples collected post-weaning, piglets will be selected, blood-sampled and killed (within 36h after fecal sampling), and, subsequently, the gastrointestinal tract will be removed and tissues and intestinal digesta collected.

Laboratory analyses as described in the previous paragraph will be conducted in the obtained samples and the data following statistical analyses will result in important associations between protein fermentation, PWD, pathological/functional read-outs of gut function, microbiota parameters, metabolomics analyses and immunological measures.

References

Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2008. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. Arch. Anim. Nutr. 62:343-358.
Kyriakis, S. C., V. K. Tsiloyiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A. C. Tsinas, C. Alexopoulos, and L. Jansegers. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. Res. Vet. Sci. 67:223-228.
Madec, F., N. Bridoux, S. Bounaix, and A. Jestin. 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. Prev. Vet. Med. 35:53-72.

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

This experiment is not focused on differences in response parameters between (dietary) treatments, but is aimed at obtaining samples from piglets with and without PWD under commercial conditions. Little is known about the variation in protein fermentation during PWD under commercial conditions. We, therefore, used data from experiments focusing on high or low protein diets and diarrhea in weaned piglets for power analyses. We used fecal ammonia concentrations (Heo et al., 2009) and colonic ammonia concentrations (Heo et al., 2010). We expect higher variation between animals under commercial conditions compared to experimental studies. Furthermore, variation in other read-out parameters in this experiment are expected to be higher. Therefore, the variation in the power analyses with fecal and colonic ammonia concentration was multiplied with 3. This resulted in 166 and 262 animals, when using fecal and colonic ammonia concentration, respectively, in order to obtain a power of ≥0.8. We, therefore, estimate to require 200 piglets for dissection. The main focus is on piglets with PWD and we expect greater variation in the PWD piglets, therefore, we anticipate to include 150 PWD piglets and 50 (non-PWD) control piglets.
In addition, we have consulted a statistician regarding numbers of animals and farms. There is variation between farms in incidence of PWD, and, therefore, we need to include multiple farms to obtain a representative sample of the Dutch piglet population. The inclusion of multiple farms allows us to include farm as an effect in the data analysis, in order to determine whether differences in the relation between PWD and protein fermentation (metabolites) occur between farms.
In addition, we will perform a pilot study before the start of this experiment, to determine the frequency and concentration of protein fermentation (end-products) in feces of piglets with diarrhea. This pilot study has been discussed with the Animal Welfare Body (work protocol "The concentration of protein fermentation end-products in faeces of piglets with post-weaning diarrhoea") and was not considered an animal experiment as referred to in the Dutch Act on Animal Experiments since the experimental procedures described in the protocol cause less pain or distress than the insertion of a needle under good veterinary practice. In short, in this pilot, fecal samples will be obtained from piglets in practice (multiple farms) with and without diarrhea. If piglets do not defecate spontanously when being handled, a fecal sample will be obtained via manual stimulation. Fecal consistency score and pH are determined in the fecal samples. Subsequently, fecal ammonia concentration is analyzed. Other protein fermentation end-products are also analyzed and correlated with ammonia to determine the appropriateness of fecal ammonia as an indicator of protein fermentation. These pilot data are required to determine the criteria for the selection of piglets with PWD in this experiment and will also be used to verify the required number of piglets, but we do not expect to require more than 200 piglets.

Data from this experiment will be analyzed using multivariate analyses. For instance, metabolomics data from piglets with and without PWD will be analyzed by partial least squares discriminant analysis. In addition, functional read-outs of gut function will be analyzed with principal component analysis and the following principal components will be subsequently related to protein fermentation indices.

References
Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2009. Feeding a diet with decreased protein content reduces indices of protein fermentation and the incidence of postweaning diarrhea in weaned pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. J. Anim. Sci. 87:2833-2843.
Heo, J. M., J. C. Kim, C. F. Hansen, B. P. Mullan, D. J. Hampson, and J. R. Pluske. 2010. Feeding a diet with a decreased protein content reduces both nitrogen content in the gastrointestinal tract and post-weaning diarrhoea, but does not affect apparent nitrogen digestibility in weaner pigs challenged with an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Anim. Feed. Sci. Technol. 160:148-159.

## B. The animals

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

Piglets will be used in this experiment, because this is the target animal. This experiment is aimed at the variation present in the Dutch piglet population and, therefore, no appropriate model is available.

Piglets will be collected from multiple commercial farms. At each farm, we will select and kill piglets for sample collection. These selected piglets will include healthy control piglets (i.e. no diarrhea) and piglets with PWD. Sexe will be recorded, but is not used as a selection criterion, because it is not expected that PWD, and the relation with protein fermentation, differs between sexe. Potential differences in the ratio between male and female will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from commercial farms.
A total of 200 piglets will be sacrificed for sample collection. These 200 piglets will be selected based on criteria (i.e. fecal consistency, pH, ammonia concentration; verified in the pilot study) and in order to obtain these 200 piglets, rectal fecal samples will be collected from more piglets. In addition, to identify the presence of pathogens or microbial biomarkers before the onset of PWD, fecal samples will be collected from piglets in the pre-weaning and early post-weaning period as well. It is beforehand unknown which piglets will develop PWD. Assuming that the required 200 piglets will be obtained from 5 farms (i.e. 40 piglets per farm), with a division of 30 PWD and 10 control piglets at each farm, and a prevalence of 5% PWD on the day of selection for dissection, fecal samples in the pre-weaning / early post-weaning period should be collected from 600 piglets at each farm (i.e. 30 / 0.05 = 600 piglets/farm). This will in total be 600 x 5 = 3000 piglets from which feces will be sampled.
Selection and dissection of piglets (with and without PWD) will be between 3-14 days post-weaning, because this is the period in which the incidence of PWD is highest.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Mild | 200 | |

**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.

Replacement: the piglet is the target animal in this experiment. This experiment is aimed at the variation present in the Dutch piglet population and, therefore, no appropriate model is available. Reduction: the number of animals is based on power analyses and this number will be verified with a pilot study. Refinement: the selection of piglets will be based on minimal invasive measures, i.e. clinical signs of PWD and rectal fecal samples. The attempts to obtain a fecal sample are confined to 3 at each time point. Killing of the piglets will be performed by skilled personnel to minimize stress.

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

Animals will be obtained from commercial farms. Individual sows and pre-weaning piglets are not included in this experiment when they have been treated with antibiotics. In the post-weaning period of sample collection, (group) antimicrobial treatments for PWD should be withheld, because treatments will affect microbial composition and microbial metabolite production and the development of PWD. In case of individual diseased piglets

(other than diarrhea), there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. After piglets are killed and sampled this experiment is finished and potential required treatments can again be applied when advised by a veterinarian according to normal Dutch legislation. Killing and dissection of piglets is performed by skilled personnel.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature overview has been made and the literature search (using google scholar) included the key words piglets, post-weaning diarrhea, gut health, dietary protein and protein fermentation. To the best of our knowledge, associations between PWD, protein fermentation and gut function measures have not been determined in commercial settings before. In addition, this project has been peer-reviewed by 5 independent reviewers and this on-farm approach was highly encouraged by the reviewers.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

The piglets in this experiment are obtained from commercial farms and, therefore, piglets are kept under commercial conditions and not all housing conditions of Annex III of the Directive 2010/63/EU are met: - 3.1b. The piglets are checked daily by the respective farmer or a qualified person (Wod), and sick piglets will be noted. Piglets with PWD cannot be treated immediately, because our objective is to determine the mechanisms underlying diarrhea in piglets, including microbial composition and production of microbial metabolites, and antibiotic treatment will interfere with these measurements. - 3.3b and 3.6a: no bedding material will be provided. Environmental enrichment will be as usual at each specific farm. - Table 7.3: the surface area for piglets will be according to commercial conditions.

**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.
[X] Yes > Describe this establishment.

The experiment will take place at commercial pig farms, which are not official establishments licensed by the NVWA.

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

Piglets will be sampled and dissected at commercial pig farms. It is of importance that the conditions are in agreement with commercial practices. Before piglet selection and dissection, the respective farm personnel will perform daily routine inspections. Fecal samples before dissection are collected by a qualified person (Wod). Killing and dissection will be performed by qualified persons.

# 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, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Selected piglets will be blood-sampled and killed for sampling of tissues and intestinal digesta. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

During the (post-weaning) period of fecal sampling and until dissection, no antimicrobial treatments should be provided for PWD. This might result in a higher incidence or severity of PWD.

Explain why these effects may emerge.

Withholding antimicrobial treatments might increase the incidence or severity of PWD.

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

Antimicrobial treatments cannot be applied because these treatments will interfere with the measurements. No specific measures are taken to minimize adverse effects, but piglets will be inspected daily by the respective farm personnel. In case of diseased piglets (other than diarrhea), there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. At each specific farm, the day of selection and dissection will be determined following discussion with the respective farmer, to determine the day at which PWD prevalence is usually highest. Our experience is that this is usually around 4-7 days post-weaning. Assuming the onset of PWD is at 3-4 days post-weaning, this means that the period of not treating piglets is kept between 1-3 days, However, the exact window of selection and dissection will be determined with the respective farmer, but will be at maximum until day 14 post-weaning.

## 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.

Antimicrobial treatments (for PWD) should be withheld in de post-weaning period, because antibiotics will interfere with the measurements. In case of sick piglets, there will be discussion between researchers, the respective farmer and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required. For instance, piglets showing severe lethargy can be euthanized when advised by the veterinarian.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of humane endpoints to occur in the post-weaning period is estimated at 3%, i.e. slightly higher than the average mortality rate in the Dutch weaned piglet population of 2.2%.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort in this experiment is estimated to be mild. Experimental conditions are according to commercial settings, except that no antimicrobial treatments can be provided in the sampling period (mild). Discomfort related to rectal fecal sampling, blood sampling and killing is also estimated as mild.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Piglets need to be killed in order to collect the required samples.

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

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

[X] Yes

16.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>2 | Type of animal procedure<br>Digestibility experiment with piglets |

# 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.

Environmental conditions can affect the animals' microbiota composition. It has been consistently demonstrated that pigs kept under low sanitary conditions (resulting in a lower sub-clinical health status of the herd) have a reduced nitrogen digestibility compared with pigs kept under high sanitary conditions (Kampman-van der Hoek et al., 2016; van der Meer et al., 2016). This effect is likely mediated through the microbiome. It illustrates that steering of protein fermentation in the gut is dependent on the (environmental, sanitary) status under which the pigs are kept. The aim of this experiment is, therefore, to test the effect of sanitary conditions (as a model for pig farms with a reduced health status), dietary crude protein (CP), and their interaction, on CP digestion and fermentation, fermentation end-products, and piglet performance. The experiment will be designed in a 2 x 2 factorial arrangement with sanitary conditions (high, HSC; or low, LSC) and dietary digestible CP content (high, HCP; or low, LCP) as factors. Output parameters will be ileal and total tract nutrient digestibility, feces quality (consistency score, dry matter content, and pH), body weight gain, and feed efficiency. In addition, metabolites of protein fermentation (e.g. ammonia, amines, phenols and sulfides) in feces will be measured.

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

The contrast in sub-clinical health status will be according to van der Meer et al. (2016). Briefly, piglets will be obtained from a commercial nursery farm in the Netherlands. At 4 weeks of age, piglets will be transported to the experimental farm and allocated to LSC or HSC treatments. At arrival, piglets will be weighed and HSC piglets will receive anthelmintic treatments, whereas LSC piglets will remain untreated. HSC and LSC piglets are housed in separate rooms. HSC piglets will be housed in thoroughly cleaned and disinfected pens and a strict hygiene protocol (including showering, change of clothes, hairnet, and face mask) will be adhered when entering the HSC room (unpublished data). A mixture of manure of commercial pig farms will be spread weekly in the LSC pens to increase pathogenic pressure and no hygiene protocol will be applied (unpublished data). In addition, LSC piglets will be exposed to nylon bags containing a mixture of pig manure and straw, ground to pass a 1 mm screen, as a model for dust (unpublished data).
From arrival until 6 weeks of age, piglets will receive the same weaner diets as they received in the nursery farm. At 6 weeks of age piglets will be weighed and feeding of experimental piglet diets will start. Within sanitary status, pens of pigs will be randomly assigned to LP or HP diets. Diets will be fed for 4 weeks and piglets will be weighed every two weeks.
At 10 weeks of age, piglets will be sacrificed and intestinal contents from the ileum and colon will be collected. At maximum 48 h before dissection, piglets will be housed individually and will be adapted to frequent feeding. Starting from 24h before dissection, pigs will be frequently fed (once every

6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. Our experience is that if pigs are used to meal feeding and will remain on the same diet, pigs will readily adapt to individual housing and frequent feeding.

References
van der Meer, Lammers, Jansman, Rijnen, Hendriks, and Gerrits. Performance of pigs kept under different sanitary conditions affected by protein intake and amino acid supplementation. J Anim Sci (2016) 94:4704-4719.

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

The number of replicate pens per treatment has been calculated by power analysis (Proc Power; SAS 9.3) using data from a previous experiment with comparable design (with 6 piglets per pen; unpublished data). Because ileal CP is considered a main output parameter for the current experiment, this parameter is used for the power analysis. In the previous experiment, only total tract CP digestibility was measured (unpublished data). From literature (de Vries et al, 2014), it is calculated that the variation in ileal CP digestibility measurements is 3 x larger than total tract CP digestibility measurements. Assuming a residual standard deviation of 4.4 (3 x 1.47; unpublished data) and averages of ileal CP digestibility of 70, 82, 79, and 85% for the four treatments, it follows that n=9 at a power of 0.8. The standard deviation used in the power analysis is based on a previous study (unpublished data) where 6 piglets per pen were used. We, therefore, include 6 piglets per pen as well. This number of piglets per pen also resembles the practical situation.

References
de Vries, Pustjens, van Rooijen, Kabel, Hendriks, and Gerrits. Effects of acid-extrusion on the degradability of maize dried distillers grain with solubles in pigs. J Anim Sci (2014) 92:5496-5506.

**B. The animals**

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

In total, 216 female piglets will be used in this experiment divided over 3 batches (72 piglets per batch). Piglets will be housed with 6 piglets per pen and pen will be considered the experimental unit. The 4 dietary treatments will be tested in 3 pens each batch, resulting in 9 replicates per treatment.
Piglets will be obtained from a commercial nursery at 4 weeks of age and remain in the experimental facilities until 10 weeks of age.
Only female piglets will be used to exclude a potential effect of sexe. Because female animals generally respond more intense to immune

interventions than male animals, we have chosen to use female piglets to maximize contrasts between treatments. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial farm.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Mild | 216 | |

**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.

Replacement: The piglet is the target animal in this experiment. The interaction between sanitary status and protein fermentation cannot be tested with ex vivo techniques. Hence, it was chosen to test this in an in vivo experiment. Reduction: The number of piglets to be used has been based on previous observations and is minimized to the number needed to detect differences between the treatments. Contrasts between the treatments are maximized within the range observed in practical settings, to minimize the number of piglets needed. Refinement: Piglets will be group-housed for the major the part of the study and the duration of individual housing is limited to 48h to minimize discomfort. In addition, during individual housing, pigs will be able to see and hear each other, have snout contact and will receive toys as enrichment.

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

All animal handling procedures will be conducted by experienced staff (feeding, weighing, transport). Various, non-destructible toys will be made available to the pigs as environmental enrichment, both during group- and individual housing, and toys will be alternated regularly. Occurence of clinical health issues due to sanitary conditions is not expected based on previous studies (van der Meer et al 2014 and unpublished data). However, in case of clinical signs of illness, there will be discussion between researchers, animal caretakers and a veterinarian to determine is further measures are required. No exceptional adverse effects of this experiment on the environment are expected.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature overview on this topic has been performed. To the best of our knowledge, the interactive effects of sanitary conditions and dietary protein level on protein fermentation and its end-products has not been performed previously. If newly published papers indicate novel insights in the topic that have not been taken into account but are of relevance for the proposed experimental design, experimental procedures will be reconsidered.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Housing and care is according to Annex III, except during the last 48h of the experiment, when pigs will be housed individually in pens. Individual housing during this period is needed to make sure that every animal consumes feed at each time point a meal is given (once every 6h from 24-6h prior to dissection and once every hour from 6h prior to dissection). This is required to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract. The pigs will be housed on partially-slatted floor pens with rubber mats in temperature-controlled rooms. The floor area of the pens in which pigs will be individually housed, will be min. 2 m2, allowing the pigs to move around freely. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Rubber mats will be removed 3 days before individual housing, because can pigs

consume pieces of rubber mat as well. During individual housing, pigs will be able to see and hear each other and have snout contact. Animals will receive toys as enrichment.

**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, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Pigs might experience pain during killing. The potential pain is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

Previous studies using the same contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2014 and unpublished data) did induce differences in sub-clinical health status. It is possible that piglets in the low sanitary status treatment develop clinical health problems, however, the previous studies (van der Meer et al., 2014 and unpublished data) showed no adverse effects of the low sanitary status on animal welfare. Pigs might experience stress as a result from individual housing.

Explain why these effects may emerge.

The potential adverse effects can occur due to the sanitary conditions. Individual housing is required to feed individually and frequently to obtain a steady-state in the gastro-intestinal tract.

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

Occurence of clinical health issues due to sanitary conditions is not expected based on previous studies (van der Meer et al., 2014 and unpublished data). In case of clinical signs of illness, there will be discussion between researchers, animal caretakers and a veterinarian to determine is further measures are required. The period of individual housing is restricted to 48h and pigs will be able to see and hear each other, have snout contact and pigs will receive toys as enrichment.

**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.

Based on previous studies using the same contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2014 and unpublished data), the procedures are not expected to give rise to circumstances that require humane endpoints. In the case of clinical illness in the expert opinion of the veterinarian, animals will be removed from the experiment. In addition, animals are removed from the experiment in case of body weight loss (>10% compared to previous weighing).

Indicate the likely incidence.

Based on our previous experiments the likely incidence is estimated to be below 5%.

**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 expected level of discomfort is classified as mild. The low sanitary conditions treatment may result in a lower sub-clinical health status. Based on previous studies using the same contrasts in sanitary conditions (van der Meer et al., 2014 and unpublished data), the level of discomfort for the LSC treatment is judged as mild.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Pigs will be killed and dissected after the procedures. This is necessary to obtain samples for digestibility measurements.

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

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

[X] Yes

17.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>3 | Type of animal procedure<br>Digestibility experiment with cannulated pigs |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The ratio between protein and fermentable fiber plays an essential role in the dynamics of protein fermentation (Le Gall et al., 2007). The inclusion of fermentable fiber in the diet is, therefore, a potential nutritional solution for reducing (detrimental effects of) protein fermentation (metabolites). The aim of this experiment is, therefore, to test the effect of fermentable fiber (FF), crude protein (CP), and their interaction, on the extent of fermentation, fermentation end-products, microbial colonization, digesta passage rate, and feces quality. The experiment will be designed in a 3 x 2 factorial arrangement with dietary FF content (low FF, high FF, low FF+FF infused in colon) and CP (two protein isolates varying in protein structure) entering the colon as factors. The selection of protein sources will depend on the data obtained in appendix 7 and literature. Diets will have low or high FF contents. Apart from affecting fermentation in the large intestine, dietary FF will affect endogenous protein losses, fermentation, and microbial biomass in the small intestine, thereby changing the substrate arriving at the colon. A third treatment where the low FF is fed and FF is infused in the colon, will be tested to separate the effects of FF in the small intestine from fermentation characteristics in the large intestine. Output parameters will be total tract nutrient digestibility, digesta retention time in the large intestine, feces quality (consistency score, dry matter content, and pH), and microbiota composition in feces. In addition, a combination of targeted and untargeted metabolomics in feces and blood samples will be used to measure metabolites of protein fermentation.

Reference: Le Gall M, Quillien L, Seve B, Guéguen J, Lalles JP. Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (L.) lectin and pea albumin 2. JAS. 2007; 85:2972-2981.

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

After arrival, pigs will be allowed to acclimatize to the new environment for a minimum of 8 days. Fecal grab samples are taken and analyzed for the presence of parasites. If required pigs will receive anthelmintic treatment. During the acclimatization periods, pigs will be socialized according to a fixed protocol. Pigs will be surgically fitted with a cannula in the distal ileum and a catheter in the jugular vein. After surgery pigs are allowed to recover and adapt to the housing conditions for a minimum of 7 days before they are switched to the experimental diets.
Immediately after surgery, pigs are kept on a soft pad under a heating lamp until pigs can regulate their body temperature again. Rectal temperature is regularly monitored, for at least 3 days after surgery. Body weight will be determined upon arrival of the pigs, and after surgery weekly until the end of the last experimental period.

After recovery from surgery, the experimental phase will start and samples will be collected from each pig during 6 subsequent measurement periods. This approach is selected to allow within pig comparisons of the dietary treatments (Latin square design), minimizing the total duration of the experiment, thereby the risk of cannula and catheter complications. Each period will consist of 5 days adaptation to the experimental diet, followed by collection of ileal digesta during 12 hours on days 6 and 7, infusion of protein/fermentable fiber and markers to estimate mean retention time of the digesta into the colon (via the cannulas) at day 8 and urine+feces collection and blood sampling (via the catheter) at days 9-11. Such a time frame (6 periods x 11 days) is commonly used in studies with ileal cannulated growing pigs. To collect feces quantitatively, plastic bags will be attached to the rear end of the pigs as described by Van Kleef et al. (1994). Clean urine will be quantitatively collected using funnels underneath the cage.

Reference
van Kleef, Deuring, and van Leeuwen. A new method of faeces collection in the pig. Lab Anim (1994) 28: 78-79.

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

The number of replicates per treatment has been based on literature where similar output parameters were studied (Bach Knudsen et al. 2007; de Vries et al. 2016; Otto et al. 2003, Wilfart et al. 2007). For the most important parameters, power was calculated for several experimental design scenarios according to the method of Stroup (1999), using the data presented in these studies. It was concluded that a 6x6 Latin square design gave sufficient power (between 0.8 and 0.9) for the most important parameters (nutrient digestibility, SCFA concentrations in peripheral blood, large intestinal retention time).

References

Bach Knudsen, Jørgensen, and Canibe. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat- or oat-based rolls. Br J Nutr (2007) 84:449-458.
de Vries, β-Glucans and resistant starch alter the fermentation of recalcitrant fibers in growing pigs. PlosOne (2016) 11: e0167624.
Otto, Yokoyama, Hengemuehle, Bermuth, van Kempen, and Trottier. Ammonia, volatile fatty acids, phenolics, and odor offensiveness in manure from growing pigs fed diets reduced in protein concentration. J Anim Sci (2003) 81: 1754-1763.
Wilfart, Montagne, Simmins, Noblet, and van Milgen. Br J Nutr (2007) 98:54-62.
Stroup. Mixed model procedures to assess power, precision, and sample size in the design of experiments. Proc Biopharm Am Stat Assoc (1999) 15-24.

## B. The animals

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

Eight barrows (approximately 25 kg) will be obtained from a commercial pig farm. Only pigs that are healthy without hernias (testicular or umbilical), damaged ears or unsound feet are selected, because these can complicate surgery. Surgery will be performed on 8 pigs. Two pigs will be considered spare animals and will be used in the case of problems with digesta collections or catheter patency. If pigs are replaced by spare pigs during the experiment, observations can be included in the statistical analyses, provided that these pigs have been used for at least two of the experimental periods. Should problems arise during the last period, the measurement period will be extended by one period. Pigs will be approximately 60-70 kg at the end of the experiment.
Barrows will be used so that urine and feces can be collected separately. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial farm.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Moderate | 8 | |

**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.

Replacement: The pig is the target animal in this experiment. Although fermentation can be tested in vitro, the complex interactive effects of dietary protein and fermentable fiber with passage rate and bacterial colonization on fermentative processes cannot be tested with ex vivo techniques. Hence, it was chosen to test this in an in vivo experiment. Reduction: A Latin square design is used to minimize the number of pigs needed. Refinement: Before surgery pigs will be socialized for a minimum of 5 days (according to a socialization protocol), so that they are well adapted to handling procedures after surgery and during sampling.

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

Surgical procedures will be conducted under complete anesthesia, and adequate analgesics are used during recovery. No exceptional adverse effects of this experiment on the environment are expected.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature overview on this topic has been performed. To the best of our knowledge, the interactive effects of fermentable fiber and dietary protein structure on the combination of protein fermentation, its end-products and passage rate and digestibility have not been performed previously. If newly published papers indicate novel insights in the topic that have not been taken into account but are of relevance for the proposed experimental design, experimental procedures will be reconsidered.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental period in temperature controlled rooms. The floor area of the pens will be min. 2 m2, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas and catheters of pen mates. Pigs will be able to see and hear each other. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements. Animals will receive toys as enrichment, which are regularly changed.

**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.

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

[] Yes > Describe this establishment.

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

# Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

[] No > Continue with question I.

[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor 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.

Surgical procedures will be performed under anesthesia. After surgery, animals will be treated with analgesics for at least 3 days and with antibiotics. The potential pain experienced during killing is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

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

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

Individual housing, fasting prior to surgery and recovery from surgical procedures may have adverse effects on animal welfare. Infection and inflammation due to the presence of the cannula and/or catheter may occur.

Explain why these effects may emerge.

These adverse effects may emerge because they are part of the experimental procedures.

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

Infection and inflammation will be prevented or minimised by providing antibiotics after the surgical procedures and whenever required based on clinical signs of infection. Long-term effects of antibiotic treatment on the microbiota are minimised by administering the antibiotics intramusculair/in the wound (and not orally) and by allowing a recovery period of (a minimum of) 7 days and an adaptation period of 5 days to the diet. Adverse effects on animal welfare due to individual housing are minimised by providing toys as environmental enrichment and pigs will be able to see and hear each other.

**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.

Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply: • During recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days and subsequently produce feces, indicating blockage of the intestines. • A cannula is lost and cannot be placed back. • A pig has fever during 5 successive days, is not responding to treatments proposed by a veterinarian, and shows signs of infection and inflammation. • A pig has feed refusals exceeding 20% of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days. • In the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results. • A pig suffers from body weight loss (>10%) during a 14 day period.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% (20% due to technical problems with the cannula).

**K. Classification of severity of procedures**

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

The level of discomfort is expected as follows: • Surgical procedures: moderate • Sampling procedures (9.5 weeks): mild • Individual housing in the absence of bedding material in large metabolism pens (11 weeks): moderate. The cumulative discomfort in this experiment is estimated at moderate.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Pigs will be killed after the procedures. Keeping pigs with a cannula is complicated. Moreover, the location of the cannula and tip of catheter need to be verified during autopsy.

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

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

[X] Yes

18.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>4 | Type of animal procedure<br>Digestibility experiment with broilers |

# 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.

Protein fermentation is likely involved in the occurrence of gut health problems and diarrhea. The aim of this experiment is to determine the contribution of different protein sources and levels to hind gut protein fermentation in broilers and determine its effects on gut health, protein fermentation metabolites and performance.

**Experimental diets**

Broilers will be fed, from hatch to 29 days of age, different experimental diets in a 3x2 complete randomized block design. The diets will consist of one of 3 different protein sources (from ingredients currently used in poultry feed), at 2 levels of ileal protein digestibility. In vitro tests (in vitro pre-digestion, to simulate gastric and enteric digestion, followed by gas production method, to simulate hind gut fermentation) will be used prior to the feed trial to determine which protein sources will be added into the experimental diets and which method(s) of creating poorer digestible proteins will be used.

**Read-out parameters**

The following measurements will be recorded:

- performance measurements (feed intake, water intake, weight gain)
- litter and cloaca scores
- ileal & fecal crude protein and amino acids digestibility (marker method)
- Di-animo-pimelic acid (DAPA), indicator of microbial biomass, measured in ileal and cecal digesta
- untargeted metabolomics and biogenic amines targeted metabolomics (using serum, cecal and colon digesta)

- intestinal lesion scores
- relative organ weights (proventiculus, gizzard, duodenum, jujenum, ileum, ceca, colon, pancreas and liver)
- cecal digesta pH
- gut leakage (using serum marker: fluorescein isothiocyanate (FITC)-Dextran)
- villus height and crypt depth
- microbiota population in ceca

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

Individual tags:

On day 0 all birds are given individual neck labels. This is necessary to allow us to link metabolic data from individual birds to their growth performance and individual gut health measures. Secondly, tagging is needed to guarantee we can separate birds if they accidentally mix at a young age.

Weighing & cloaca scores:
Individual weighing is done on day 0, 7, 14, 21 and 28. Simultaneously, a cloaca score is given each chick (1 minute/bird/time point). This is the most practical and least stressful method as they are only handled once per time point.

Fecal collection:
During the last 4 days of the trial broilers are placed on slats to allow fecal collection. Prior to these last 4 days broilers will be housed on comfortable SoftCell bedding.

Blood sampling:
Prior to the dissection a single blood sample is taken from each broiler for metabolomics measurements. Blood samples are taken by an experienced technician.

Dissection:
Organs and digesta for the broilers will be collected for the above mentioned read-out parameters. Broilers are fasted 3 hours and then allowed to feed for 3 hours prior to euthanasia (on day 29), to ensure the presence of sufficient digesta in the different parts of the GIT (de Vries et al., 2014). Particularly for the determination of CP, amino-acids and markers in ileal digesta, large quantities of digesta are needed.

Reference
de Vries, S., Kwakkel, R.P., Pustjens, A.M., Kabel, M.A., Hendriks, W.H. and Gerrits W.J.J., 2014, Separation of digesta fractions complicates estimation of ileal digestibility using marker methods with Cr2O3 and cobalt-ethylenediamine tetraacetic acid in broiler chickens. Poultry Science 93:2010–2017

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

We will use an in vitro digestibility and fermentation trial prior to this trial to select feed ingredients and by doing so less experimental diets are included in this research. Selection of ingredients will be based on the contrast in hind gut protein fermentation that can be created. We will determine this by measuring a simulated ileal protein digestion and the soluble fraction that is left after digestion. As it is known that in poultry fractional separation occurs and that mostly the soluble components enter the ceca (de Vries et al., 2014), which is the main site of fermentation. The availability of protein for cecal bacteria in the undigested soluble fraction is then measured using the gas production technique (Cone et al., 2005). Both measures (digestibility and fermentibility) are used as selection criteria.

Sample size determination:

There are no metabolomics data available to use for sample size determination. Pre-cecal CP digestibility is our second most important read-out parameter. We also consider growth performance important measurements.

We consider a difference in digestibility of 2.5% between treatments to be relevant. We would like to detect differences with a significance level α = 5% and a power β = 80%.
In previous trials using male broilers, a standard deviation for ileal CP digestibility of 2.53% (Qaisrani et al., 2015) and 1.78% (personal communication) was found. This standard deviation is based on including 8 male broilers per pen. Based on this we assume σ = 2.15%.

Calculation of the number of replicate pens:

$n = \{ [Z(\alpha/2) + Z\beta]^2 \} / [ (\Delta/\sigma )^2 ]$

Following formula will be used to determine sample size:

Using prerequisites, following values can be obtained from the Standard Normal Curves Areas table (Ott and Longnecker, 2010) or calculated:
$Z_{0.05/2}=1.96$
$Z_{0.80} = 0.85$
$\Delta = 2.5$
$\sigma = 2.15$

Thus:
$n = (1.96 + 0.85)^2 / (2.5 / 2.15)^2 = 5.84$

It can be deduced from this statistical power analysis that 6 repetitions are required per treatment group.

Number of birds per pen:

The variation used for the power analysis is based on previous studies (Qaisrani et al., 2015 and recent unpublished data) in which 8 male broilers per pen were used. However, for digestibility analysis fewer broilers are required. For ileal CP and amino acid digestibility analysis we require at least 5 grams of digesta dry matter. We should be able to obtain 1.14 g dry matter from the terminal ileum of a broiler (Kluth et al., 2005). Based on this information we assume we need to pool digesta of at least 5 birds and also in a previous trial (unpublished data) pooled digesta of 5 birds was enough for CP and amino acid analysis.

However, reducing the number of birds per pen may increase the variation between the pens, and will result in a higher number of pens required to obtain a minimal power of 80%. We do not have data from which we can calculate the effect of reducing the number of birds per pen on the statistical power. We assume, however, that increasing the number of replicates will increase the power while reducing the number of birds. So, instead of using 6 replicates with 8 birds per pen (48 birds per treatment), we will use 5 birds per pen with 8 replicates (40 birds per treatment). Additionally, we expect a maximum mortality in the first week of 4%. To be able to deal with this 2 additional birds per treatment should be added. If necessary these extra birds will be reallocated to a pen within treatment if mortality occurs in the first week.
In total 6 (3 diets x 2 degrees of protein digestibility) x 8 (replicate pens) x 5 (animals per pen) + 12 extra birds (2 per treatment) = 252 birds are required.

References

Cone, J.W., Jongbloed, A.W., Van Gelder, A.H. and de Lange L., 2005, Estimation of protein fermentation in the large intestine of pigs using a gas production technique. Ani. Feed Sci. Tech. 123-124:463-472
Kluth, H., Mehlhorn, K. and Rodehutscord, M., 2005, Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. Archives of Animal Nutrition, 59(4):271-279
Ott, R.L. and Longnecker, M., 2010. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Brooks/Cole Cengage Learning, ISBN-13: 978-0-495-01758-5

Qaisrani, S.N., van Krimpen, M.M., Kwakkel, R.P., Verstegen, M.W.A. and Hendriks, W.H., 2015, Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers. Poultry Science 94:2152–2164

## B. The animals

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

Animals used will be *Gallus gallus domesticus* (domestic chickens), fast growing strain (Ross 308), males and will be obtained from a commercial hatchery. The species chosen is the target species of the study.

Gender related differences are not of interest in this study. To maintain maximum accuracy of measurements it is necessary to use birds with similar genetics and a similar gender. Since absorption of nutrients and metabolism are highly different between male and female chicks, the experiment is done in one sexe to decrease the variation in measurements. Males are preferred over females as they have a higher metabolic rate and feed intake, which should allow for more sample collection (digesta) per individual. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial hatchery.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|

Gallus gallus domesticus, Ross 308 Mild. 252

**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.

Replacement Broilers are the species of interest. The present animal experiment cannot be replaced by an experiment using another animal species due to the specificities of the avian digestive tract. A mechanistical modelling approach is excluded due to the complexity of interactions and modulators (largely still unknown) involved in protein fermentation. To our knowledge, such a model does not exist, let alone a model which can simulate the effects of protein fermentation on gut health and performance. As a consequence, this experiment has to be conducted with chickens. Reduction There are in vitro tests that aim to predict ileal protein digestibility and can be used for studying hind gut fermentation. These can, however, not replace the animal model, since they lack the interaction with the gut wall. Especially in these experiments where the effect on (gut-) health is studied, this interaction is highly relevant. In vitro tests will be used to get an indication of the order of possible protein fermentation, as described above. These in vitro tests will be used to determine feed ingredients prior to this trial, reducing the number of experimental groups required. Furthermore, we strive to collect as many samples (organs, blood, digesta) as possible from each individual chick, instead of using different chicks for different measurements. The number of replicates is determined using a sample size determination formula to ensure a minimal number of replicates is used while maintaining statistical power. Refinement We choose measurements that can be performed after killing of the birds and we reduced the time broilers spend on slats to just the last 4 days. Killing, blood sampling and neck labeling will be performed by experienced technicians.

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

Birds will be group housed in floor pens with SoftCell bedding (except during the last four days when they are group housed on slats without SoftCell bedding) and have perches. As mentioned above, invasive measurements during life other than a single blood sampling have been avoided. To our knowledge there are no environmental disadvantages to this trial.

# 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.

An extensive literature review has been conducted and very little is known about the mechanisms involved in protein fermentation and how this affects the animal's health. Also to the knowledge of the authors metabolic profiles related to protein fermentation in broilers have never been recorded. Knowledge of these metabolic profiles is expected to be very important in the improvement of gut health in farm animals and hence the reduction of antibiotic use.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Housing and care is according to Annex III, except during the last four days when birds will be housed on slats, which is needed for fecal collection. The perches will remain in the pens in this period.

**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, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Minor pain could be induced by neck labeling, blood sampling and euthanasia. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

Diarrhea might occur in the groups fed lower digestible proteins.

Explain why these effects may emerge.

Birds are fed lower digestible proteins as it is part of the aim of this study to investigate hind gut protein fermentation (which results from undigested proteins passing the ileum).

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

Other than lower dietary digestible protein in some of the treatment groups, all diets will be formulated to meet broiler requirements, with a similar fiber level. Fresh bedding will be provided after regular litter scores. Drinking nipples (checked daily) will be kept clean to avoid water spillage.

**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.

There is a very small chance of severe weight loss due to diarrhea. If a bird loses 10% or more of its body weight compared to the previous weighing, it is removed from the trial and killed according to a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU. If a bird shows clinical signs of sickness (diarrhea, inactivity, lack of appetite), there will be discussion between researchers, animal caretakers and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of this we expect to be very low (below 5%), as all diets will be formulated with sufficient nutrients for growth, although broilers fed the lower digestible proteins are expected to have a lower growth response.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort is classified as mild.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

This is required for the collection of ileal and cecal contents and organ samples.

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

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

[X] Yes

19.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>5 | Type of animal procedure<br>Experiment with broilers to evaluate feed strategies to reduce protein fermentation |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The experiment described in appendix 4 should have given insight into the contribution of different protein sources and levels to hind gut protein fermentation (metabolites) and its effects on gut health and performance in broilers. The aim of this experiment is to determine if potential nutritional strategies, such as including fermentable fiber and providing a coarse diet structure, can affect protein fermentation (metabolites) and improve gut health of broilers.

**Experimental diets**

Broilers will be fed from hatch to 29 days of age, different experimental diets in a 2x2x2 design. Included factors are diet structure (particle size), fiber level and protein source. Fibers are known to be the preferred energy source of microbiota in the gut. In the presence of fibers, undigested proteins are not used as an energy source by the microbiota but can be used as a nitrogen source for microbial growth. Such a fiber feed strategy might reduce the production of (harmful) protein fermentation metabolites. A coarse dietary structure is expected to reduce passage rate and increase peristalsis and anti-peristalsis and therefore improve ileal protein digestibility. Further details of the diets will be determined based on the results of appendix 4 and the in vitro test (Boisson two-step, to simulate gastric and enteric digestion, followed by gas production method, to simulate hind gut fermentation). The contrast in dietary protein will be based on ileal crude protein and amino acid digestibility measures.

**Read-out parameters**

The following measurements will be recorded:

- Performance measurements (feed intake, water intake, weight gain)
- Untargeted and targeted metabolomics (using serum, cecal and colon digesta, we will be targeting metabolites that have been found to be associated with hind gut protein fermentation in experiment 1)
- Litter and cloaca scores
- Di-animo-pimelic acid (DAPA), indicator of microbial biomass, measured in ileal and cecal digesta
- Intestinal lesion scores
- Relative organ weights (proventiculus, gizzard, duodenum, jejenum, ileum, ceca, colon, pancreas and liver)
- Cecal digesta pH, gut leakage (using serum marker)
- Villus height and crypt depth

- Ileal and colon amino acid digestibility (marker method)
- Microbiota population in the ceca
- Passage rate

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

Individual tags:

On day 0 all birds are given individual neck labels. This is necessary to allow us to link metabolic data from individual birds to their growth performance. Secondly, tagging is needed to guarantee we can separate birds if they accidentally mix at a young age.

Weighing & cloaca scores:
Individual weighing is done on day 0, 7, 14, 21 and 28. Simultaneously, a cloaca score is given to each chick (1 minute/bird/time point). This is the most practical and least stressful method as they are only handled once per time point.

Passage rate measurements:

5 broilers per pen will be orally dosed with 3 gel capsules containing an insoluble and soluble indigestible marker. At each time point (30, 90, 180, 270 and 360 min. after oral dosage), one bird per pen is euthanized, after which the contents of the different gastro-intestinal segments are collected.

Fecal collection:
During the last 4 days of the trial broilers are placed on slats to allow fecal collection. Prior to these last 4 days broilers will be housed on comfortable SoftCell bedding.

Blood sampling:
Prior to the dissection a single blood sample is taken from each broiler for metabolomics measurements. Blood samples are taken by an experienced technician.

Dissection:

Organs and digesta for the broilers will be collected for the above mentioned read-out parameters. Broilers are fasted 3 hours and then allowed to feed for 3 hours prior to euthanasia (on day 29), to ensure the presence of sufficient digesta in the different parts of the GIT (de Vries et al., 2014). Particularly for the determination of CP, amino-acids and markers in ileal digesta, large quantities of digesta are needed.

Reference: de Vries, S., Kwakkel, R.P., Pustjens, A.M., Kabel, M.A., Hendriks, W.H. and Gerrits W.J.J., 2014, Separation of digesta fractions complicates estimation of ileal digestibility using marker methods with Cr2O3 and cobalt-ethylenediamine tetraacetic acid in broiler chickens. Poultry Science 93:2010–2017

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

Number of replicate pens:

There are no metabolomics data available to use for sample size determination. Pre-cecal CP digestibility is our second most important read-out parameter. We consider a difference in digestibility of 2.5% between treatments to be relevant. We would like to detect differences with a significance level α = 5% and a power β = 80%. In previous trials a standard deviation for ileal CP digestibility in male broilers of 2.53% (Qaisrani et al., 2015) and 1.78% (personal communication) was found. Based on this we assume σ = 2.15%.

Calculation of the number of replicate pens:

$n = \{ [Z(\alpha/2) + Z\beta]^2 \} / [ (\Delta/\sigma )^2 ]$

Following formula will be used to determine sample size:

Using prerequisites, following values can be obtained from the Standard Normal Curves Areas table (Ott and Longnecker, 2010) or calculated:

$Z_{0.05/2}=1.96$

$Z_{0.80} = 0.85$

$\Delta = 2.5$

$\sigma = 2.15$

Thus:

$n = (1.96 + 0.85)^2 / (2.5 / 2.15)^2 = 5.84$

It can be deduced from this statistical power analysis that 6 repetitions are required per treatment group.

Number of birds per pen:
For ileal CP and amino acid digestibility analysis we require at least 5 grams of digesta dry matter. We should be able to obtain 1.14 g dry matter form the terminal ileum of a broiler (Kluth et al., 2005). Based on this information we can assume we will need to pool digesta of 5 birds.

For the passage rate measurements we will require 5 birds per pen which will be killed at different time points (van Krimpen et al., 2011).

We require different broilers to be used for digestibility and passage rate measurements because both measurements require total collection of digesta from gastrointestinal segments.
All 10 birds per pen will be needed in one of the two dissections. Therefore additional broilers are needed to deal with unexpected mortality. We expect a maximum mortality in the first week of 4%. To be able to deal with this, 3 additional birds per treatment should be added.

In total 8 (treatments) x 6 (replicate pens) x 10 (animals per pen) + 24 (3 extra birds per treatment) = 504 birds are required.

References:

Qaisrani, S.N., van Krimpen, M.M., Kwakkel, R.P., Verstegen, M.W.A. and Hendriks, W.H., 2015, Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers. Poultry Science 94:2152–2164

Ott, R.L. and Longnecker, M., 2010. An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis. Brooks/Cole Cengage Learning, ISBN-13: 978-0-495-01758-5

Kluth, H., Mehlhorn, K. and Rodehutscord, M., 2005, Studies on the intestine section to be sampled in broiler studies on precaecal amino acid digestibility. Archives of Animal Nutrition, 59(4):271-279

Van Krimpen, M.M., Kwakkel, R.P., Van Der Peet-Schwering, C.M.C., Den Hartog, L.A. & Verstegen, M.W.A. (2011) Effects of dietary energy concentration, nonstarch polysaccharide concentration, and particle sizes of nonstarch polysaccharides on digesta mean retention time and gut development in laying hens. British Poultry Science 52:6.

## B. The animals

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

Animals used will be *Gallus gallus domesticus* (domestic chicken), fast growing strain (Ross 308), males, ages from 0 days to slaughter age and will be obtained from a commercial hatchery. The species chosen is the target species of the study.

Gender related differences are not of interest in this study. To maintain maximum accuracy of measurements it is necessary to use birds with similar genetics and a similar gender. Since absorption of nutrients and metabolism are highly different between male and female chicks, the experiment is done in one sexe to decrease the variation in measurements. Males are preferred over females as they have a higher metabolic rate and feed intake, which should allow for more sample collection (digesta) per individual. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will be obtained from a commercial hatchery.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Gallus gallus domesticus, Ross 308 | Mild | 504 | |

## 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.

## C. Re-use

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

[] No
[] Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

## D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement Broilers are the species of interest. The present animal experiment cannot be replaced by an experiment using another animal species due to the specificities of the avian digestive tract. A mechanistic modelling approach is excluded due to the complexity of interactions and modulators (largely still unknown) involved in protein fermentation. To our knowledge, such a model does not exist, let alone a model which can simulate the effects of protein fermentation on gut health and performance. As a consequence, this experiment has to be conducted with chickens. Reduction There are in vitro tests that aim to predict ileal protein digestibility and can be used for studying hind gut fermentation. These can, however, not replace the animal model, since they lack the interaction with the gut wall. Especially in these experiments where the effect on (gut-) health is studied, this interaction is highly relevant. Furthermore, we strive to collect as many samples (organs, blood, digesta) as possible from each individual chick, instead of using multiple birds for multiple measurements, reducing the number of birds required. Passage rate measurements, however, requires killing of birds a specific time points and use of all the digesta from all gastrointestinal tract segments, therefore these birds cannot be used for ileal digestibility analysis. The number of replicates is determined using a sample size determination formula to ensure a minimal number of replicates are used while maintaining statistical power. Refinement We choose measurements that can be performed after killing. Blood sampling and neck labling will be performed by experienced technicians.

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

Birds will be group housed throughout the trial, in floor pens with SoftCell bedding and have perches. During the last four days, when birds are housed on slats, perches will still be available. As mentioned above, invasive measurements during life, other than a single blood sampling, have been avoided. To our knowledge there are no environmental disadvantages to this trial.

# 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.

An extensive literature review has been conducted and very little is known about the mechanisms involved in protein fermentation and how this affects the animal's health. This experiment is a continuation of appendix 4 in which we aim to discover metabolic profiles related to protein fermentation. In this experiment we will examine how feeding strategies change these profiles and potentially, identify mechanisms underlying gut health. This knowledge is expected to be very important in the improvement of gut health in chickens and hence the reduction of antibiotic use.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Housing and care is according to Annex III, except during the last four days when birds will be housed on slats without bedding material, which is needed for fecal collection. The perches will remain in the pens in this period.

**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, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

Minor pain could be induced by neck labeling, blood sampling and euthanasia. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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?

Diarrhea might occur in the groups fed lower digestible proteins, lower fiber levels and pellets with fine particles.

Explain why these effects may emerge.

Birds are fed diet contrasting in protein digestibility, fiber content and structure as it is part of the aim of this study to investigate how these contrasts in feed affect hind gut protein fermentation and gut health.

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

Other than these contrasts, all diets will be formulated to meet broiler requirements. Fresh bedding will be provided after regular litter scores. Drinking nipples (checked daily) will be kept clean to avoid water spillage.

**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.

There is a very small chance of severe weight loss due to diarrhea. If a bird loses 10% or more of its body weight compared to the previous weighing, it is removed from the trial and killed according to a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU. If a bird shows clinical signs of sickness (diarrhea, inactivity, lack of appetite), there will be discussion between researchers, animal caretakers and, if required, with a veterinarian to determine if further measures are required.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of this we expect to be very low (below 5%), as all diets will be formulated with sufficient nutrients for growth, although broilers fed the lower digestible proteins are expected to have a lower growth response.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort is classified as mild.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

**L. Method of killing**

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

This is required for the collection of ileal and cecal contents and organ samples.

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

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

[X] Yes

20.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>6 | Type of animal procedure<br>Transgenerational effects of protein fermentation metabolites in poultry |

# 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.

Dietary protein fed to broiler breeders can affect broiler offspring performance (Rao et al., 2009). To date, the mechanisms by which broiler offspring is affected by maternal feeding is not known. We hypothesize that metabolites produced upon protein fermentation in the ceca of broiler breeders are absorbed and transferred to the eggs, which may cause imprinting in the broiler offspring decreasing intestine function. If maternal nutrition indeed affects intestine function in the offspring, maternal feeding could be used as a nutritional strategy to improve gut health in the offspring.

**General design**

Thirty-two female broiler breeders will be group-housed and divided over two dietary treatments, differing in ileal protein digestibility to obtain a contrast in protein entering the ceca. Protein sources will be selected based on the outcome (i.e. ileal protein digestibility) of in vitro and in vivo broiler experiments described in appendix 4. These diets will be fed to broiler breeders for 5 weeks and, blood samples will be collected to determine (protein fermentation) metabolite profiles. In addition, broiler breeders will be weighed at the start and end of the feeding trial. Eggs will be collected from each individual broiler breeder in the last week(s) of the trial (i.e. week 4-5). Thereafter, broiler breeders are killed for sample collection to determine effects of dietary treatments on the gut.

Two eggs per broiler breeder are used to determine the metabolic profile in the eggs. Three eggs per broiler breeder are incubated, hatched and broiler offspring killed for sample collection (intestine, blood, liver).

**Primary outcome parameters**

Untargeted metabolomics and targeted (protein fermentation products) metabolomics will be performed in blood samples of broiler breeders, in the eggs (yolk and/or albumen) and in samples from the broiler offspring to determine changes in metabolites. Intestinal tissue samples of broiler breeders are used for morphology to determine the effects of the dietary treatment on the gut.

Samples obtained from broiler offspring at dissection (i.e. blood, organs, intestinal tissue) will be analysed on metabolite profiles and functional read-outs (i.e. morphology of intestinal samples, DNA methylation and histone modifications in intestine or liver samples). Metabolomics profiles of broiler breeders and broiler offspring are subsequently correlated with these gut parameters to establish potential pathways that are differentially activated/silenced by certain metabolites affecting gut health.

Reference

Rao, K., J. Xie, X. Yang, L. Chen, R. Grossmann, and R. Zhao. 2009. Maternal low-protein diet programmes offspring growth in association with

alterations in yolk leptin deposition and gene expression in yolk-sac membrane, hypothalamus and muscle of developing Langshan chicken embryos. Br. J. Nutr. 102:848-857.

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

Broiler breeders will be fed diets differing in ileal protein digestibility to determine transgenerational effects of protein fermentation metabolites.

**Broiler breeders**

Individual identification

Breeders will be marked with spray (not red) to enable individual identification of breeders within a pen.

Body weight

Broiler breeders will be weighed at the start and end of the feeding trial to determine potential differences in body weight between treatments. Individual birds will be placed in a crate and weighed on a weighing scale. Feed intake (per pen) will be recorded as well.

Blood sampling

At the start and end of the feeding trial, blood samples will be obtained from each broiler breeder to determine shifts in metabolite profiles due to the dietary treatments. Birds will be fixated by the animal caretaker and a blood sample will be taken from the wing vein by an experienced technician.

Artificial insemination

In order to obtain fertilized eggs, broiler breeders are inseminated. Semen will be obtained from multiple roosters from a commercial breeder company. The female broiler breeders will be inseminated twice a week in the first week and once a week in the weeks thereafter, with pooled semen.

**Eggs**

Eggs are collected in the last experimental week(s). During collection of eggs, breeders are observed continuously during that morning/day, in order to know which egg belongs to which breeder. This is required to link the egg metabolite profile to the breeder metabolite profile and still have group-housing. If there is uncertainty regarding which broiler breeder laid the egg, broiler breeders within the pen will be palpated to check the presence/absence of an egg.

Egg samples (yolk and/or albumen) are used for metabolomics analyses to determine the transfer of (protein fermentation) metabolites from broiler breeders to the eggs. The yolk sac metabolome will be analysed to understand the changes in available nutrients for the developing embryo.

**Broiler offspring**
Settable eggs will be incubated and hatched. A maximum of 96 day-old broiler chicks will be killed for sample collection (intestine, blood, liver). This approach allows us to evaluate the effects of protein fermentation on gut morphology and metabolite profile of broiler breeders and, subsequently, evaluate if these broiler breeder metabolite profiles are correlated with the egg metabolite profiles, and with the broiler offspring metabolite profiles and functional read-outs of gut health.

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

Protein sources are selected based on the outcome of the in vitro tests and in vivo broiler experiment described in appendix 4, in order to obtain a contrast in ileal protein digestion between dietary treatments.
We chose artificial insemination instead of natural fertilization, because variation between broiler breeders in different pens might increase with natural fertilization due to differences in vitality between males. Furthermore, minimal required numbers of broiler breeders for primary outcome parameters are estimated based on previous experiments and power analysis (see next paragraph).

**B. The animals**

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

Ross 308 broiler breeder females will be obtained from a commercial breeding company. Ross 308 is the most commonly used breed in North-Western Europe. Broiler breeders will be obtained between 30-40 weeks of age, in order to perform the experiment in peak production.

The primary outcome parameters for this study are the metabolite profiles in the serum samples and eggs of broiler breeder females. To the best of our knowledge, metabolite profiles have not been determined in serum or eggs from broiler breeders fed different diets to induce protein fermentation. In the study from Pieper et al. (2012), metabolite profiles were determined in colon digesta and urine in weaned piglets fed diets differing in fermentable protein and total dietary fiber level (2x2 design). Using 8 piglets per treatment, they were able to find metabolite clusters associated with the diet and identify several metabolites that differed between treatments.
A power analysis we also conducted (using the glmpower procedure of SAS 9.3), using blood uric acid levels as influenced by dietary crude protein level reported by Corzo et al. (2005). Plasma uric acid levels averaged 6.04 and 3.82 mg/dL for broilers fed high (212 g/kg) or low (173 g/kg) crude protein level, respectively, with an average SD of 1.32. Using these values and setting the power at ≥ 0.8, this requires a total of 14 animals.
We expect larger variation in metabolite profiles, because we also apply untargeted metabolomics (instead of targeted as applied in the study of Pieper et al., 2012) and we also use eggs. We, therefore, estimate to require 16 broiler breeders per dietary treatment.
Two eggs are collected from each broiler breeder to determine metabolite profiles in the eggs. Additionally, we require two eggs for incubation and hatching to determine the effects on gut parameters in the broiler offspring. To account for unsettable eggs (~9%; van Emous et al., 2013) and a

hatchability of settable eggs of 84% (van Emous et al., 2015), we collect/incubate 3 eggs per broiler breeder. These eggs are collected in one week, in order to minimize variation due to different storage times before incubation.
In total this experiment will include 32 broiler breeders and at max 96 broilers.

References

Corzo, A., C. A. Fritts, M. T. Kidd, and B. J. Kerr. 2005. Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crude protein diets. Anim. Feed. Sci. Technol. 118:319-327.
Pieper, R., K. Neumann, S. Kröger, J. F. Richter, J. Wang, L. Martin, J. Bindelle, J. K. Htoo, W. Vahjen, A. G. van Kessel, and J. Zentek. 2012. Influence of fermentable carbohydrates or protein on large intestinal and urinary metabolomic profiles in piglets. J. Anim. Sci. 90:34-36.
van Emous, R. A., R. P. Kwakkel, M. M. van Krimpen, and W. H. Hendriks. 2013. Effects of growth patterns and dietary crude protein levels during rearing on body composition and performance in broiler breeder females during the rearing and laying period. Poultry Sci. 92:2091-2100.
van Emous, R. A., R. P. Kwakkel, M. M. van Krimpen, H. van den Brand, and W. H. Hendriks. 2015. Effects of growth patterns and dietary protein levels during rearing of broiler breeders on fertility, hatchability, embryonic mortality, and offspring performance. Poultry Sci. 94:681-691.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Ross 308 broiler breeder females | Mild | 32 | |
| Ross 308 broiler offspring | Mild | 96 | |

**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.

Replacement: the broiler breeders are the target animal in this experiment. There are no appropriate models available to study the (protein fermentation) metabolites produced by broiler breeders, the transfer of these metabolites to the egg and the effects on the gut of the broiler offspring. Reduction: artificial insemination is used instead of natural fertilization in order to minimize variation due to differences in vitality between males. In addition, required numbers of animals are estimated based on literature and power analysis. Refinement: broiler breeders will be checked twice daily by qualified personnel on general health and behavior. In case of disease, this will be discussed between the researcher, animal caretaker, veterinarian and/or animal welfare officer to determine appropriate actions. Broiler breeders will be group-housed and will be provided with sufficient feeding- and drinking places, perches and bedding material. In addition, laying nests will be provided to the broiler breeders. Skilled personnel will handle the animals in order to minimize stress during procedures such as weighing and blood sampling. In addition, the light in the stable will be dimmed prior to catching the birds.

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

Birds are group-housed, provided with sufficient bedding material and will have perches. Birds will be checked twice daily on general health and behavior. Climate conditions will be checked twice daily as well and immediately adjusted if required. Dimming the light before handling the birds (for weighing, blood sampling) allows the birds to become calm. Fresh bedding material will be provided regularly, to minimize the risk of wet litter and ammonia emission.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature survey has been conducted using google scholar and key words including broiler, broiler breeder, dietary protein, protein fermentation, transgenerational and metabolic programming. Especially in rodent models, there is substantial evidence linking maternal nutrition to offspring health and disease. The mechanisms underlying such transgenerational effects remain largely unknown. In poultry, very little data are available on this topic. To the best of our knowledge, (serum) metabolome profiles in broiler breeders in relation to dietary protein and transfer of (protein fermentation) metabolites to eggs have not been determined before.

# 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, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

## H. Pain and pain relief

Minor pain can be experienced during blood sampling and killing. The potential pain described is minor and short-term, and, therefore, no pain relieving methods are applied.

[] 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 is a very small chance that broiler breeders might develop diarrhea due to the dietary treatments.

Explain why these effects may emerge.

A diet inducing protein fermentation is part of the experimental design. This diet is required to study (transgenerational) effects of protein fermentation metabolites.

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

Fresh bedding material will be provided regularly, to minimize the risk of wet litter (due to diarrhea) and subsequent effects on legs and skin of the broiler breeders.

## 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.

Body weight loss due to diarrhea is possible in broiler breeders fed a protein source of low digestibility. If broiler breeders show clinical signs of diarrhea/sickness, birds will be weighed and birds are removed from the trial in case of 10% body weight loss (compared to the start weight). Injuries such as a broken wing or leg can occur similarly as in practice. If these injuries occur, these will be noticed during daily inspections. Birds are removed from the trial and killed according to a method listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is estimated at 1%.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The discomfort in this experiment is estimated to be mild. This is based on weighing (mild), blood sampling (mild) and artificial insemination (mild) of broiler breeders and killing of broiler breeders and offspring.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Broiler breeders and broiler offspring are killed to collect samples (i.e. intestinal tissues).

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

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

[X] Yes

21.

Appendix
Description animal procedures

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

# 1 General information

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10400 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Wageningen University | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures.<br>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | Serial number<br>7 | Type of animal procedure<br>Uremic toxin production during the in vitro fermentation of proteins in ileal digesta of pigs |

# 2 Description of animal procedures

## A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

During fermentation of proteins, organic acids are produced. Some of these organic acids are known as uremic toxins (i.e. p-cresol sulfate and indoxyl sulfate) in human renal transplant patients. These uremic toxins are also produced during protein fermentation in the hindgut of piglets and might be detrimental for post-absorptive health, thereby reducing overall piglet health and performance. The first step is to determine which uremic toxins can be produced during fermentation of different proteins. This experiment is, therefore, aimed at establishing predictive relations between the (amino acid) composition of ileal undigested proteins and the formation of uremic toxins (i.e. a group of protein fermentation metabolites) during their subsequent fermentation in vitro.
Eight pigs will be fitted with a cannula in the distal ileum. After a recovery and adaptation period, pigs will be subjected to eight experimental diets in 8 periods in a latin-square design. These diets will differ in dietary protein source and/or structure (i.e. amino acid composition). These proteins will be selected based on data from literature and from the results of the in vitro study described in appendix 4. During each period, ileal effluents will be collected and pooled by diet for further in vitro analysis. As a secondary objective fecal samples and clean urine samples will be analyzed for uremic toxins, the end-products of protein fermentation.

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

After arrival, pigs will be allowed to acclimatize to the new environment for a minimum of 8 days. During the acclimatization periods, pigs will be socialized according to a fixed protocol.
Eight growing barrows, ± 25 kg BW will be fitted with a cannula in the distal ileum under inhalation anesthesia. Pigs will be fasted prior to the surgery and will be treated with adequate painkillers and antibiotics during recovery. Pigs will be allowed to recover from the surgery and to adapt to housing conditions for a minimum of 7 days. Immediately after surgery, pigs are kept on a soft pad under a heating lamp until pigs can regulate their body temperature again. Rectal temperature is regularly monitored, for at least 3 days after surgery. After recovery from surgery, ileal effluents will be collected from each pig during 8 subsequent measurement periods. Each period will consist of a 5 day adaptation period, followed by collection of ileal digesta during 12 hours on days 5 and 7. Ileal digesta will be pooled per pig over the experimental period and diet will be stored at -20°C pending analysis. This approach is selected to ensure the ileal digesta for further in vitro studies is originating from the same pigs. The latin-square approach minimizes the number of pigs needed for this study, and has also been proposed by the expert working group of the FAO (2014). Feces will be sampled during day 3, 4 and 6 and urine samples will be collected from funnels mounted underneath the metabolism cage. To collect feces quantitatively, plastic bags will be attached to the rear end of the pigs as described by Van Kleef et al. (1994).

References:
- Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods; Report of a FAO Expert Working Group, ISBN 978-92-5-108695-7, FAO 2014
- van Kleef, Deuring, and van Leeuwen. A new method of faeces collection in the pig. Lab Anim (1994) 28: 78-79

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

This experiment is not designed to detect statistically significant differences in the composition of ileal digesta among protein sources. It is designed to provide representative samples of ileal digesta of the selected protein sources, with the objective to further study the fermentation of the undigested proteins in these samples. Hence, ileal digesta harvested from the pigs will be pooled by dietary treatment for the analysis of amino acid composition and will be the basis for a series of in vitro studies into the production of uremic toxins during fermentation (not described in this application). In addition, the effects of the protein sources on fecal characteristics and urinary excretion of uremic toxins will be analysed following a normal latin-square design.

**B. The animals**

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

Eight growing barrows (± 25 kg BW) will be purchased from a commercial pig farm.
Only pigs that are healthy without hernias (testicular or umbilical), damaged ears or unsound feet are selected, because these can complicate surgery. Male animals will be used to ease collection of feces without contamination with urine. Barrows will be used as entire males will be difficult to handle at the end of the trials. The choice for one sexe will not lead to a surplus in breeding stock of experimental animals, because animals will

be obtained from a commercial farm. No spare pigs will be used, but in case no samples can be collected from two pigs for at least two periods, an extra collection period will be added. Pigs will be about 30 kg BW at the onset of the trial, and 60-70 kg BW at the end of the trial. This is a comparable BW range as used previously at our facilities, and well within the range of BW, maintaining healthy pigs and functional cannulas used in published literature. The use of growing pigs for this research is recommended by the FAO (2013). Body weight will be determined upon arrival of the pigs, and after surgery weekly until the end of the last experimental period.

Reference:
Dietary protein quality evaluation in human nutrition; Report of an FAO Expert Consultation, ISBN 978-92-5-107417-6, FAO 2013

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---|---|---|---|
| Pigs | Moderate | 8 | |

**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.

Replacement: In this experiment, the connection with protein fermentation in the renal transplant cohort of the [redacted] is important. Obtaining ileal effluents from humans is complicated, and the pig is recommended by the FAO committee as a model for evaluating Digestible Indispensable Amino Acid Scores (DIAAS) of human foods. This choice is well documented in the FAO report (2013 ). Reduction: The protein sources used in this experiment will be selected based on the in vitro (small intestinal) digestion study described in appendix 4, to ensure a contrast in amino acid composition of ileal digesta large enough for this study. Using a latin-square design, within pig variability can be separated from the variation between protein sources, hence minimizing the number of pigs to be used for the study of uremic toxin excretion, and that the pooled ileal digesta to be used for subsequent in vitro fermentation studies originate from the same pigs. Refinement: after careful consideration, the length of the adaptation period, depending on the number of days the animal needs for adapting to new diets between experimental periods, was reduced from 12 to 5 days. In this way, every period within each trial lasts 7 days instead of 14 days, reducing the total duration of each trial to 8 weeks, which is often used for evaluating effects of fibrous diets. This decision fits within the procedures proposed by the FAO (2014), and is based on the notion that adaptation of small intestinal passage rates and digestive secretions to different protein sources is much quicker than the adaptation of the colon microbiota to changes in fiber sources. Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs, in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained. Before surgery pigs will be socialized for a minimum of 5 days (according to a socialization protocol), so that they are well adapted to handling procedures after surgery and during sampling. References: - Research approaches and methods for evaluating the protein quality of human foods; Report of a FAO Expert Working Group, ISBN 978-92-5- 108695-7, FAO 2014 - Dietary protein quality evaluation in human nutrition; Report of an FAO Expert Consultation, ISBN 978-92-5-107417-6, FAO 2013

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

Surgical procedures will be conducted under complete anesthesia, and adequate painkillers are used during recovery.

# Repetition and Duplication

**E. Repetition**

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

A literature search has been performed in Scopus (13-4-2017), using the search terms “uremic toxin”, “protein fermentation”. Although the production of uremic toxin following protein fermentation is well documented (particularly in relation to kidney patients), no efforts have been published predicting the composition of uremic toxins from variation in the amino acid composition of proteins flowing into the colon. No literature sources were found with similar objectives as described in this appendix.

# Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

[] No
[X] Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental periods in temperature controlled rooms. The floor area of the pens will be min. 2 m2, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas of pen mates, but audio-visual contact will be possible. The use of bedding material is avoided as this will prevent the collection of clean urine samples from funnels mounted underneath the cage.

**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, analgesiaor 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.

Surgical procedure will be performed under anesthesia. After surgery, animals will be treated with painkillers (at least 3 days) and with antibiotics.

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

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

Individual housing without bedding material, fasting prior to surgery and recovery from surgical procedures may have adverse effects on animal welfare. Infection and inflammation due to the presence of the cannula and/or catheter may occur. Digestive problems (i.e.diarrhea) with changes in the diet are not expected based on previous experience and because there is an adapatation period to each diet.

Explain why these effects may emerge.

These adverse effects may emerge because they are part of the experimental procedures.

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

Infection and inflammation will be prevented or minimised by providing antibiotics after the surgical procedures and whenever required based on clinical signs of infection. Adverse effects on animal welfare due to individual housing are minimised by providing toys as environmental enrichment and pigs will be able to see and hear each other.

**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.

Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply: • during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce feces, indicating blockage of the intestines or inflammation of the peritoneum. • a cannula is lost and it cannot be placed back into the distal ileum immediately. • a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation. • a pig has feed refusals exceeding 20% of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days. • in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results. • a pig suffers from body weight loss (>10%) during a 14 day period

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% during the 8 week duration of the trial (20% due to technical problems with the cannula). The major portion of this 25% is expected to occur during the first two days following surgery. In addition, technical failure of cannulas will lead to removal of the pig from the experiment. If this leads to discomfort of the pig, it will be for a very short period of time.

**K. Classification of severity of procedures**

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Surgical procedure (including fasting): moderate • Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (10 weeks): moderate • The sampling procedures of ileal digesta (2 days during each of 8 subsequent weeks): mild • Attaching plastic bag for collecting feces (when ileal digesta are not collected): mild. Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

# End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

[] No > Continue with Section 3: 'Signatures'.
[X] Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Keeping pigs with a cannula in the distal ileum after the experiment is finished is undesirable from an animal welfare point of view.

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

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

[X] Yes

22.

[redacted]

**Van:** DEC WUR <dec@wur.nl>
**Verzonden:** donderdag 7 september 2017 8:37
**Aan:** 'info@zbo-ccd.nl'
**Onderwerp:** RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD1040020171667

**Categorieën:** Dossier: [redacted]

Beste [redacted]

Excuses, die zin is er per abuis in blijven staan. Voor het opstellen van een advies maak ik gebruik van een standaard document en B4 wordt daar uit gehaald indien niet van toepassing. Dat had in dit geval ook moeten gebeuren. Er waren geen DEC-leden betrokken bij het project; alle aanwezige DEC-leden waren betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.
Zal ik een aangepast advies opsturen of is deze mail voldoende?

Met vriendelijke groeten,

[redacted]

---
[redacted]

[redacted]
---

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

**From:** info@zbo-ccd.nl [mailto:info@zbo-ccd.nl]
**Sent:** woensdag 6 september 2017 14:14
**To:** DEC WUR
**Subject:** Verzoek aanvullende informatie projectvergunningsaanvraag AVD1040020171667

Geachte DEC Wageningen UR,

Op 10-05-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'To determine the telation between protein

fermentation and gut health in pigs and poultry' met aanvraagnummer AVD1040020171667.

In uw advies geeft u onder B4 aan: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Licht toe waarom. Kunt u aangeven of er sprake is geweest van uitsluiting van leden, en indien dit het geval is hoeveel leden er waren uitgesloten en waarom?

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

Centrale Commissie Dierproeven

23.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AW WAGENINGEN

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

**Onze referentie**
Aanvraagnummer
AVD1040020171667

Datum 8 september 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 10 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry" met aanvraagnummer AVD1040020171667. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

**Onduidelijkheden**
In Bijlage Dierproeven 3.4.4.2 geeft u onder H aan dat de dieren pijn kunnen ondervinden bij het doden en niet verdoofd worden. Kunt u toelichten welke dodingsmethode u toepast, of het doden volgens praktijkomstandigheden gebeurd en of de methode benoemd staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU?

**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.

**Datum:**
8 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1040020171667

**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: Wageningen University & Research

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD1040020171667

**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:**
8 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1040020171667

## 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

Gevraagde informatie

In de brief van 8 september 2017 heeft de CCD om aanvullende informatie gevraagd in aanvraagnummer AVD1040020171667. Hieronder vindt u de gevraagde informatie.

In Bijlage Dierproeven 3.4.4.2 zal een overdosis anesthesie met voorafgaande sedatie gebruikt worden als dodingsmethode (zoals genoemd in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU). Aangezien ook bij verdoving (via injectie) kortdurende pijn ervaren zou kunnen worden door het dier, hebben we bij H aangegeven dat pijn kan voorkomen tijdens het doden.
De complete procedure voor dissectie voor het verzamelen van ileale digesta is als volgt:
1. Twee dagen voor dissectie worden varkens individueel gehuisvest.
2. Vanaf 24 tot 6 uur voor dissectie worden de varkens iedere 6 uur gevoerd.
3. Vanaf 6 uur voor dissectie worden de varkens ieder uur gevoerd.
4. Tien minuten voor dissectie worden de varkens verdoofd middels intraveneuze injectie. Hierna zijn de varkens ontspannen, stil en met de ogen bijna helemaal dicht.
5. De varkens worden overgebracht naar een andere ruimte, waar de buikholte wordt geopend en het maagdarmpakket wordt verwijderd onder anesthesie.
6. Direct na het verwijderen van het maagdarmpakket worden de varkens gedood met een overdosis anesthesie.

---

Myrthe Gilbert, PhD
[redacted]

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

**From:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
**Sent:** vrijdag 8 september 2017 11:56
**To:** Vergunningenloket <vergunningen@wur.nl>
**Cc:** [redacted]
**Subject:** Aanhouden AVD1040020171667

Geachte meneer, mevrouw,
Op 10 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry" met aanvraagnummer AVD1040020171667. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op.
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 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

25.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research
[redacted]
Postbus 59
6700 AW WAGENINGEN

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

**Onze referentie**
Aanvraagnummer
AVD1040020171667
**Bijlagen**
1

Datum 18 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 10 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry" met aanvraagnummer AVD1040020171667. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de dodingsmethode van Bijlage Dierproeven 3.4.4.2.

**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 "To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry" starten. De vergunning wordt afgegeven van 18 september 2017 tot en met 1 mei 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Hierbij wijzen wij u erop dat de locatie waar u de dierproeven wilt uitvoeren, VOORAF aangemeld moet zijn bij NVWA. Dit kan door een e-mail te sturen aan CHD@nvwa.nl met de gegevens van de vergunninghouder en gegevens van de nieuwe locatie.

Uit de memorie van toelichting bij de dierproevenregeling:
2.1.1 Direct melden van wijzigingen met betrekking tot de instellingsvergunning
Na verlening van een instellingsvergunning zal de vergunninghouder wijzigingen die betrekking hebben op de instellingsvergunning onverwijld door moet geven aan de Minister. Het gaat daarbij om wijzigingen in één van de personen die op grond van artikel 6, derde lid, van de wet in de instellingsvergunning worden vermeld, en elke significante wijziging van de structuur of de werking van een inrichting die het dierenwelzijn negatief kan beïnvloeden. Hierbij moet worden gedacht aan gevallen waarbij op basis van de gewijzigde situatie mogelijk anders op een aanvraag om een instellingsvergunning zou zijn beslist, dan wel wijzigingen die bekend moeten zijn bij de toezichthouder met het oog op inspecties. Hieronder valt in ieder geval elke nieuwe locatie waar proefdieren worden gehuisvest of dierproeven worden verricht, grootschalige verbouwingen op deze locaties en reorganisaties. De vergunninghouder geeft deze wijzigingen door aan de Minister. De wijzigingen moeten worden doorgegeven zodra de vergunninghouder hier redelijkerwijs van op de hoogte kan zijn.

**Procedure**
Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 25 juli 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 7 september 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Dit betrof de eventuele betrokkenheid van DEC-leden bij de beoordeling van de aanvraag. 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]

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: | Wageningen University & Research |
| Adres: | Postbus 59 |
| Postcode en plaats: | 6700 AW WAGENINGEN |
| Deelnemersnummer: | 10400 |

deze projectvergunning voor het tijdvak 18 september 2017 tot en met 1 mei 2021, voor het project "To determine the telation between protein fermentation and gut health in pigs and poultry" met aanvraagnummer AVD1040020171667, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 mei 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 juli 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 juli 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 25 juli 2017, ontvangen op 25 juli 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 september 2017

**Aanvraagnummer:**
AVD1040020171667

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---|---|---|
| **3.4.4.1 On-farm piglet experiment** | | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) / | 200 | Licht | |
| **3.4.4.2 Digestibility experiment with piglets** | | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) / | 216 | Licht | |
| **3.4.4.3 Digestibility experiment with cannulated pigs** | | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) / | 8 | Matig | |
| **3.4.4.4 Digestibility experiment with broilers** | | | | |
| | Kippen / | 252 | Licht | |
| **3.4.4.5 Experiment with broilers to evaluate feed strategies to reduce protein fermentation** | | | | |
| | Kippen / | 504 | Licht | |
| **3.4.4.6 Transgenerational effects of protein fermentation metabolites in poultry** | | | | 32 broiler breeder females<br>96 broiler offspring |
| | Kippen / | 128 | Licht | |
| **3.4.4.7 Uremic toxin production during the in vitro fermentation of proteins in ileal digesta of pigs** | | | | |
| | Varkens (Sus scrofa domesticus) / | 8 | Matig | |

**Aanvraagnummer:**
AVD1040020171667

**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:**
AVD1040020171667

# 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.

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

1765

Centrale Commissie Dierproeven 1.

23 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* | 11600 |
| ☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen* | |

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

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.

| | | |
|---|---|---|
| Naam instelling of organisatie | Academisch Ziekenhuis Leiden | |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [redacted] | |
| KvK-nummer | 27366422 | |
| Straat en huisnummer | Albinusdreef | 2 |
| Postbus | 9600 | |
| Postcode en plaats | 2300 RC | Leiden |
| IBAN | NL11DEUT0451001400 | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | LUMC | |
| (Titel) Naam en voorletters | [redacted] | |
| Functie | PhD Student | |
| 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<br>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<br>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
| 2.2 | Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is? | ☐ 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 - 6 - 2017 |
| | | Einddatum | 1 - 6 - 2021 |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | The role of the coagulation system on microvascular rarefaction | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | De rol van stolling op het verlies van microvasculaire vaatjes | |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | Naam DEC | DEC Leiden |
| | | Postadres | [redacted], LUMC<br>Postbus 9600<br>2300 RC Leiden |
| | | 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 | Gemandateerd vergunninghouder |
| Plaats | Leiden |
| Datum | 18 - 7 - 2017 |
| Handtekening | [redacted] |

# Form
## Project proposal

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

## 1 General information

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 11600 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | LUMC |
| 1.3 | Provide the title of the project. | The role of the coagulation system on microvascular rarefaction |

## 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.

Atrial fibrillation (AF) is the most common type of irregular heartbeat. In AF, disorganized electrical signals cause the upper chambers of the heart to contract very fast and irregular. AF commonly progresses from paroxysmal self-terminating to persistent non-self-terminating AF. This suggests that there are different stages of the disease presented with the same

arrhythmia. The persistent form does not return to normal sinus rhythm on its own within 7 days and requires some form of treatment. An electrical shock can be used to 'reset' the heart or heart tissue can be scarred by ablation. AF frequently starts unnoticed, which allows it to progress freely and cause adverse events before it is detected[1].
Although not benign, AF patients have a five-fold increased risk for stroke compared to those without AF. This is due to a hypercoagulable state in the atria during the fast and irregular contraction. During an AF episode, blood can pool in the atria and form a clot, when the clot breaks free it can enter the bloodstream and cause a stroke. Anticoagulant medication is the first-line treatment used by most of the AF patients. Today the "ideal" anticoagulant treatment is based on direct anticoagulants (DOACs) acting on coagulation factors thrombin (FIIa) and Xa (FXa) with high specificity and efficacy[2]. Besides the risk for stroke, in time, AF patients develop fibrotic scar-tissue in the atrial myocardium that progressively interferes with the normal direction/flow of the electrical wave triggering irregular conduction of the atria. Vice versa, atrial ischemia inflicted by excessive use of ATP and low perfusion during AF further, induces fibrosis, driving the vicious cycle in the progression of AF[3].

Preliminary data from our [redacted] consortium (Grant awarded by Dutch Heart Foundation) demonstrated a two-fold loss of atrial microvasculature in AF patients compared to patients in normal sinus rhythm. Microvascular rarefaction is measured as the loss of endothelial cell (EC) and pericytes (PC), the main cell types forming the microvasculature[4].

[redacted]

We hypothesize that atrial fibrillation leads to an ischemia-induced hypercoagulable state of the vasculature, leading to microvascular destabilization/ pericyte loss and eventually fibrosis (Figure 1). Our aim is to confirm our hypothesis and identify optimal anticoagulant treatment to counteract both the risk for stroke and progression of atrial fibrosis.

We will assess our hypothesis and novel potential anticoagulant treatment options in our established mouse model of ischemia reperfusion (I/R) injury of the kidney. A chronic AF mouse model and imaging techniques on the beating mouse heart are not yet developed. The link between microvascular loss and fibrosis has been studied in great detail by our group in the I/R kidney model and, over the years, we learned that this model is ideally suited to quantitatively and qualitatively investigate microvascular rarefaction[6]. While cardiac I/R models have been described and display various aspects of microvascular loss, the lower reproducibility and reduced capabilities for microvascular imaging in future experiments (beating heart vs. immobilized kidney) make our kidney model the model of choice to test our hypothesis. In addition, microvascular loss is also a main driver of chronic kidney disease (CKD) that is the topic of active investigation in our department[7]. The results obtained in this project may be directly translated to benefit our preclinical programs aimed at the development of improved clinical approaches to counteract CKD[8].

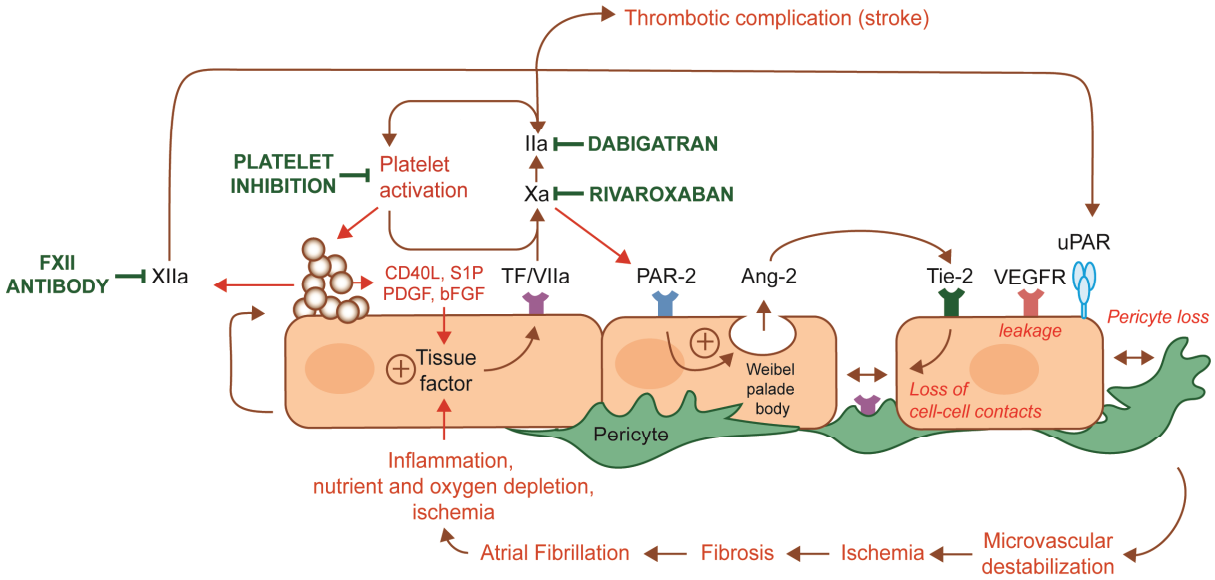



Figure 1. **Hypothesis how AF conditions trigger hyper coagulation and destabilization of the microvasculature.** AF may induce ischemia/ inflammation, through tissue factor (TF) expression on ECs, either directly and/or via platelet activation, subsequently initiating protease activated receptor 2 (PAR-2) activation via the coagulation cascade leading to microvascular destabilisation, which will eventually lead to activation of pro-fibrotic pathways. Angiopoietins regulate microvessel integrity via binding to the endothelial Tie-2 tyrosine kinase receptor. Angiopoietin-1 (Ang1), produced by pericytes, supports endothelial stabilization, while Ang-2, produced by activated ECs, promotes pathological angiogenesis, vascular permeability and inflammation. PAR-2 has been reported to participate in EC integrity by activating the major proangiogenic genes Tie-2/Ang2[4&9]. PAR-2 can be activated by the coagulation proteases Factor VIIa (FVIIa) and Factor Xa (FXa). These proteases function upstream of thrombin (IIa) in the coagulation cascade and are known to trigger TF-dependent thrombin generation and blood coagulation[10]. Dabigatran is a direct inhibitor of thrombin, whereas Rivaroxaban inhibits thrombin indirectly via the inhibition of its upstream protease FXa. Thus, we predict that Rivaroxaban treatment protects against microvascular destabilization and the formation of fibrosis, compared to Dabigatran treatment. Recently, platelets have been shown to activate FXII, which makes platelets even more potent in generating thrombin[11]. In vitro, we have shown that primed ECs activate blood platelets, which mediate a switch of TF-protein into its coagulant-active form. Once ECs and platelets trigger the formation of thrombin, the EC-monolayer is disrupted, leading to exposure of pericyte-derived TF, which will even further potentiate activation of coagulation. Therefore, we hypothesize that inhibition of platelet activity in combination with Rivaroxaban may augment protection against vascular destabilization and fibrosis in an I/R model.

References

1) Burstein B, Nattel S. Atrial Fibrosis: Mechanisms and Clinical Relevance in Atrial Fibrillation. Journal of the American College of Cardiology 2008. 51 (8) pp: 802-809.

2) Kumar et al., Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulants and Antiplatelet Therapy for Stroke Prevention in Patients With Atrial Fibrillation. Cardiol Rev. 2016. 24: 218-23.

3) Schotten U, Verheule S, Kirchhof P and Goette A. Pathophysiological Mechanisms of Atrial Fibrillation: A Translational Appraisal. Physiol Rev 2011. 91: 265–325.

4) Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen VM, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K, Saharinen P. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin β1 activation. Nat Commun. 2015 Jan 30;6:5962.

Kamphuisen, Hugo ten Cate, Harry J. Crijns, Isabelle C. Van Gelder, Anton Jan van Zonneveld, Ulrich Schotten.
8) David D. McManus, Jane S. Saczynski, Jeanine A. Ward, Khushleen Jaggi , Peter Bourrell, Chad Darling, Robert J. Goldberg. The Relationship Between Atrial Fibrillation and Chronic Kidney Disease : Epidemiologic and Pathophysiologic Considerations for a Dual Epidemic. JAFIB. 2012 Vol 5. Issue1.
9) Zhu T1, Sennlaub F, Beauchamp MH, Fan L, Joyal JS, Checchin D, Nim S, Lachapelle P, Sirinyan M, Hou X, Bossolasco M, Rivard GE, Heveker N, Chemtob S. Proangiogenic effects of protease-activated receptor 2 are tumor necrosis factor-alpha and consecutively Tie2 dependent. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006 Apr;26(4):744-50.
10) Camerer E1, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 9;97(10):5255-60.
11) Joanne L. Mitchell, Ausra S. Lionikiene, Georgi Georgiev, Anja Klemmer, Chelsea Brain, Paul Y. Kim and Nicola J Mutch. Polyphosphate co-localizes with factor XII on platelet-bound fibrin and augments its plasminogen activator activity. Blood 2016 :blood-2015-10-673285.

**3.2 Purpose**

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

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

The main objective of the current project is to study the components that lead to hypercoagulability and the effect of anticoagulant interventions and/or platelet inhibition on vascular remodelling in a kidney I/R injury model. The role of coagulation in AF is recently shown by our [redacted] consortium and others, however the mechanism behind coagulation-induced fibrosis is not yet clarified. We propose that ischemia triggers hypercoagulation leading to microvascular destabilization and eventually fibrosis. We want to show the effect of coagulation on ischemia-induced microvascular loss using DOACs. [redacted]

The following research questions will be addressed, based on the most effective DOACs, platelet inhibitor or biological inhibitor (antibody) at the time of experiment:

1) Does FXa (Rivaroxaban) inhibition attenuate IRI-induced microvascular loss/ fibrosis?

2) Is the use of a FXa-inhibitor (Rivaroxaban) more efficient in preventing IRI-induced microvascular loss/fibrosis than a FIIa-inhibitor (Dabigatran)?

3) Will FXa (Rivaroxaban) inhibition in combination with platelet inhibition attenuate IRI-induced microvascular loss/ fibrosis more potent than FXa (Rivaroxaban) inhibition alone?

4) Does FXII inhibition (antibody) attenuate IRI-induced microvascular loss/fibrosis?

5) What is the role of role of coagulation on microvascular rarefaction measured by EC/ PC loss during ischemia?

**3.3 Relevance**

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

European populations are ageing rapidly. Eurostat, the European statistics' office, reported that almost 30% of the total EU population was 55 years or older in 2010. This number is expected to rise to just over 40% by 2060. This large group of elderly people has important public health consequences, including an increasing number surviving with AF, with a related increase in their use of health care services. AF is an age-related disease and the most common sustained arrhythmia in the population. It is shown that AF progression is associated with a significant disease burden, including increased cardiovascular hospitalisation and mortality due to heart failure, stroke, or myocardial infarction. The costs of AF diagnostics and treatments are becoming a huge burden, especially due to in-patient care and it is predicted that they will rise sharply in the next decades, due to the fact that AF is a progressive disease, with progression of both the arrhythmia and the underlying cardiovascular disease.
Similar to the epidemiology of AF, the incidence of CKD underlies the same risk factors and increases with advancing age. In time, CKD progresses to end-stage renal disease (ESRD) with irreversible renal fibrosis as underlying process, which negatively affects the quality of life and life span of millions worldwide. The costs to manage CKD are high due to its progression to ESRD.

Our proposal is innovative in that it is incorporated in a bigger project collaborating with both experimental- and clinical disciplines [redacted]. This contributes to a truly translational proposal because it adopts an approach that moves from cellular- and animal research to the clinic. We expect our approach to change the clinical anticoagulant therapy approach towards patients with AF specifically and ischemic disease in general. Up to now there are no clinical studies comparing the effect of DOAC treatment on atrial remodelling in AF patients. Moreover, our work will provide leads for new upstream therapies directed at the hypoxic/ hypercoagulable state and its consequences. We envisage that our work will form the basis for the development of novel molecular treatments for AF patients and for the prevention of its progression and complications.

**3.4 Research strategy**

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

In a kidney I/R mouse model we will interfere with the coagulation cascade using inhibitors that act on different levels of the cascade. Specifically, we will inhibit thrombin or the coagulation factors leading to thrombin generation (i.e. FXa, FXIIa and/or platelets) and measure the effect on microvascular loss and fibrosis. These experiments will be carried out in a transgenic mouse strain that expresses green-fluorescent protein (GFP) under the TIE-2 promotor to trace the ECs and Tomato-red fluorescent protein (RFP) under the NG2-promotor to trace PCs. With this transgenic mouse strain we can elucidate the role of coagulation on microvascular cell fate (Figure 2).

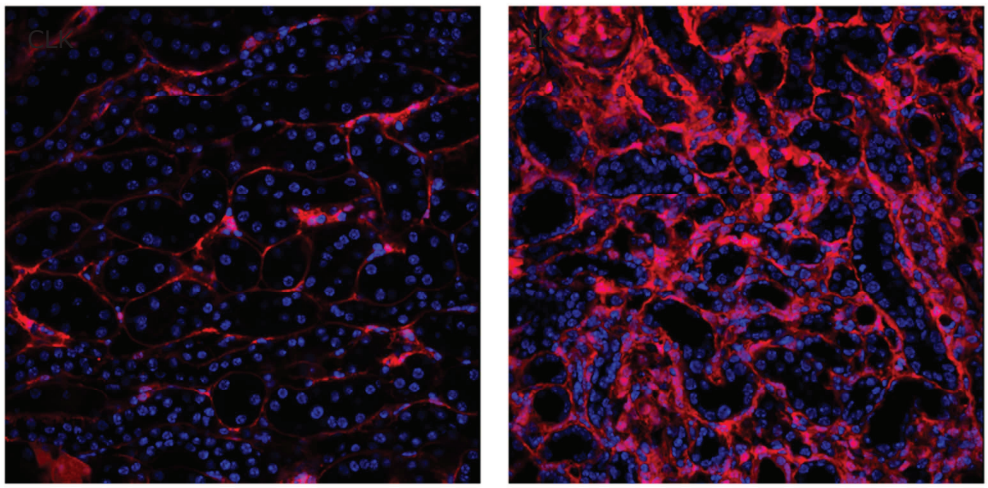



Figure 2. Mouse tomato-red expressed pericytes in the contralateral (CLK) and ischemic kidney (IK) at day 10. Pericytes are the major source of scar-producing myofibroblasts following kidney injury.

The effect of anticoagulants on I/R injury / rarefaction and fibrosis will be studied using the following ex-vivo parameters:

1)ECs and PCs will be quantified to determine microvascular loss. [IHC]

2)Fibrosis will be measured using Sirius red staining of tissue sections. [IHC]

3) The extent of kidney-injury will be quantified by staining of tissue sections for the kidney-injury-marker (KIM-1). [IHC]

4) Microvascular leakage will be visualized using a tracing protocol in which albumin that has leaked to extravascular spaces is stained with Evans Blue (Boor et al., 2015). [IHC]

IHC= Immunohistochemistry

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

The following components will be part of this project:

1)Test the combination of IHC staining in Evans blue stained kidneys from a previously performed I/R study for leakage. When possible we will combine these two read-out methods in the kidney to reduce the amount of mice to test our hypothesis.

2)Perform a pilot experiment of kidney I/R in our transgenic mouse strain (that expresses the GFP under the TIE-2 promotor to trace the ECs and the RFP under the NG2-promotor to trace PCs) to test the sensitivity of this mouse strain on ischemia and reperfusion to perform our main experiment with significant I/R time points to test our hypothesis.

3)Perform the main experiment in kidney I/R injury with the combination of anticoagulant treatment in mice to assess microvascular loss, leakage and fibrosis in this model.

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.

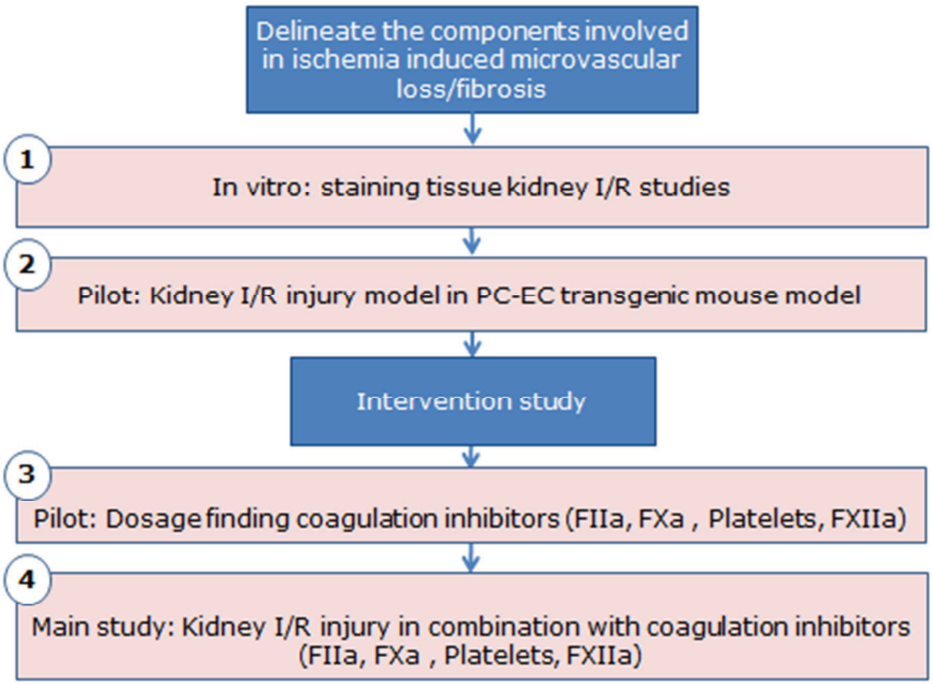



Figure 3: Outline of research strategy

1)First we will test the combination of IHC staining on Evans blue stained kidneys from a previously performed I/R study for leakage. When possible we will combine these two read out methods in the kidney to reduce the amount of mice to test our hypothesis.

Milestone 1a: The combination of IHC and Evans blue staining in kidney tissue is appropriate to combine the read outs in the same animal.

Go/ no-Go moment: We will include an animal group in the main experiment when IHC and Evans blue staining could not be combined on the same tissue.

2)Second, we will start the pilot I/R study to establish the appropriate duration of ischemia for induction of microvascular rarefaction in our transgenic (TIE2/NG2) mouse strain. The TIE2/NG2 mouse-strain has a different background than the mice in which previous kidney I/R injury was studied in (DEC: 13037 LUMC), therefore we are uncertain if they will show a similar sensitivity to ischemia.

Milestone 1b: Define the appropriate ischemia time leading to IRI-induced kidney microvascular rarefaction in our transgenic mouse strain.

Go/ no-Go moment: If the selected ischemia time points do not induce microvascular rarefaction in our transgenic mouse strain, we will have to repeat the experiment with other ischemia times. If the second time points do not show microvascular rarefaction, which will be

very unlikely based on experience, we will not continue.

3) Next we will start the pilot for dosage finding in the TIE2/NG2 transgenic mouse strain. The protocol for dosage finding is obtained from our collaborators in Maastricht (DEC: 2003-179, 2005-121, 2006-082 MUMC). We will collect blood from the mice to confirm that the dosages show the same degree of inhibition of the target activity. For Dabigatran we will perform a prothrombin time (PT), for FXII inhibition an activated partial thromboplastin time (APTT), for Rivaroxaban a FXa-activity assay (Spectrozyme Xa) and for platelet inhibition we will perform a platelet aggregation assay.

Milestone 1: The experimental dosages of anticoagulants and the antiplatelet drug represent therapeutic plasma levels in the TIE2/NG2 transgenic mouse strain.

4)Finally, we will perform the DOAC intervention in the kidney IRI model in the TIE2/NG2 transgenic mouse strain with the appropriate I/R time and read out groups.

Milestone 1: The intervention study confirms our hypothesis that specific anticoagulant therapies attenuate the loss of microvessels after I/R in the kidney.

Taken together, the kidney I/R model will form the basis to elucidate how hypercoagulability affects the integrity of the microvasculature.

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 | Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model |
| 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 | De rol van stolling op het verlies van microvasculaire bloedvaatjes |
| 1.2 | Looptijd van het project | Jun 2017- Jun 2021 |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | stolling, microvasculaire bloedvaatjes, fibrose, boezemfibrilleren, nierfalen |

## 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)

Boezemfibrilleren is één van de meest voorkomende hartritmestoornissen. Ten tijde van boezemfibrillatie is de doorbloeding van het hart verstoord wat kan leiden tot stolsels in het hart, wanneer die doorschieten en de bloedtoevoer van de hersenen blokkeren ontstaat er een herseninfarct. Daarom worden vaak antistollingsmiddelen voorgeschreven.

Boezemfibrillatie is niet direct levensbedreigend maar over de jaren verergerd de ziekte en wordt deze steeds moeilijker te behandelen. Het progressieve verloop van de ziekte ontstaat door litteken-vorming van de boezems, de boezems worden fibrotisch. Het fibrotische weefsel kan het fibrilleren opwekken en het fibrilleren leidt weer tot meer fibrose. Ons doel is om te begrijpen hoe de verlittekening van de boezems ontstaat en hoe deze tegen te gaan.

| | | |
|---|---|---|
| | | Data van hartweefsel laat een vermindering van het aantal microvasculaire vaatjes zien in patiënten met boezemfibrillatie vergeleken met patiënten met een normaal ritme. Boezemfibrilleren verstoort de bloedstroom door de vaatjes terwijl het hart veel energie verbruikt waardoor een tekort aan zuurstof ontstaat. Onze hypothese is dat zuurstoftekort de stolling activeert en leidt tot verlies van de vaatjes.<br><br>Verlies van de microvasculatuur is op onze afdeling tot in detail in kaart gebracht in een model waarbij de nier tijdelijk wordt afgesloten van zuurstof. Op dit moment is er geen bestaand model voor chronische boezemfibrillatie maar kunnen wij gebruik maken van onze expertise op het gebied van microvasculair verlies in de nier. Wij willen nu dit model gebruiken om het effect van antistollingsremmers op microvasculair verlies in kaart te brengen. Dit onderzoek kan inzicht en richting geven aan een antistolling strategie dat bij boezemfibrillatie zowel de kans op een herseninfarct als verlittekening van het hart op lange termijn tegen kan gaan. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Maatschappelijk belang:<br>Het littekenweefsel dat ontstaat bij boezemfibrillatie verstoord de geleiding wat leidt tot ritmestoornis en vice versa fibrillatie leidt tot littekenweefsel vorming, waardoor de ziekte progressief kan verlopen. Het tegengaan van dit verloop met specifieke antistolling voorkomt het progressieve verloop van de ziekte.<br><br>Wetenschappelijk belang:<br>Dit onderzoek geeft inzicht op de rol van de stollingsfactoren op stabiliteit van de microvasculaire bloedvaatjes. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Voor het onderzoek gebruiken we muizen. In dit onderzoek ligt de nadruk op de rol van de specifieke stolling remmers (gebruikt in de kliniek) die potentieel kunnen beschermen tegen het verlies van de microvasculaire vaatjes en het ontstaan van fibrose. In totaal zijn er maximaal 490 muizen voor de studie nodig. |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Alle procedures worden uitgevoerd onder narcose. Als gevolg van de procedure waar lokaal de doorbloeding naar de nier wordt geremd en weer vrijgegeven kan ongerief ontstaan. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Matig ongerief: (100%) |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | De muizen worden gedood, waarna de organen uitgebreid geanalyseerd worden. |

## **4** Drie V's

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | **Vervanging**<br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom | Voordat het besluit wordt genomen om een dierstudie uit te voeren wordt eerst gekeken of er alternatieve manieren zijn om de onderzoeksvraag te beantwoorden. De ontwikkeling van microvasculair verlies is zeer complex waarbij onder andere zowel de structuur van de nier als de bloedcirculatie betrokken is en meerdere celtypen een rol spelen. We kunnen deze reacties |

| | | |
|---|---|---|
| | proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | momenteel nog niet nabootsen in iets anders dan een levend organisme. |
| 4.2 | **Vermindering**<br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Vermindering vindt plaats door op een doordachte wijze de proef te ontwerpen zodat er zo min mogelijk dieren per groep nodig zijn. Dit doen we door een goede statistische onderbouwing van de studies te maken en gebruik te maken van jarenlange ervaring van de wetenschappers. Door een pilot studie te doen kunnen we een goede keuze maken voor de beste ischemie-reperfusie tijd, wat bijdraagt om met zo min mogelijk dieren een significant verschil te kunnen waarnemen. Daarnaast maken wij gebruik van de contralaterale nier als niet-behandelde controle. Hierdoor hebben wij geen extra controle groep nodig. |
| 4.3 | **Verfijning**<br>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 wordt gebruikt om de rol van de stollingsfactoren bij de ontwikkeling van microvasculair vaatverlies en fibrose te begrijpen en in detail te kunnen uitwerken. De muis is een zeer geschikt model omdat er veel bekend is over de biologische processen van de muis, ze veel overeenkomsten hebben met die van de mens, en er zeer geschikte technieken aanwezig zijn om microvasculair vaatverlies te kunnen bestuderen. |
| | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | Bij ongerief krijgen de proefdieren altijd adequate verdoving en pijnstilling. |

## **5** In te vullen door de CCD

| | |
|---|---|
| Publicatie datum | |
| Beoordeling achteraf | |
| Andere opmerkingen | |

# Appendix
## Description animal procedures

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

## 1 General information

| | | |
|---|---|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 11600 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | LUMC |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure.<br><br>*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.* | Serial number: 1<br>Type of animal procedure: Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model. |

## 2 Description of animal procedures

**A. Experimental approach and primary outcome parameters**

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

The well-established model of ischemia reperfusion (I/R) injury in the kidney will be used to determine the effect of the coagulation pathway in the process of microvascular rarefaction and leakage. The direct anti-coagulants (DOACs), dabigatran and rivaroxaban, platelet inhibitor and the FXII-inhibitor (antibody) are known to act on different levels of the coagulation cascade. Using these different agents in combination with the IRI model, makes it a highly suitable model to elucidate the role of the coagulation cascade on microvascular rarefaction.

We will include different animal groups related to the following read outs:

1) ECs and PCs will be quantified to determine microvascular loss. [IHC]

2) Fibrosis and the extent of kidney-injury will be quantified by staining of tissue sections with Sirius red and the kidney-injury-marker (KIM-1) respectively. [IHC]

3) Microvascular leakage will be visualized using a tracing protocol in which albumin that has leaked into extravascular spaces is stained with Evans Blue. [IHC]

Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, where we combine Evans Blue with IHC staining, we might combine read out 2 and 3 to lower the amount of animal groups when possible.

We would like to implement the following experimental setup:

Pilot groups:

1) To define the sensitivity of the project related transgenic mouse strains like TIE2/NG2 for I/R- induced microvascular loss and fibrosis, different ischemia- and reperfusion times will be tested. This pilot study will be used to choose the best I/R time for the other experiments in this Appendix. The mice will be sacrificed at day 2 (n=3) and day 14 (n=3), based on experience these time points are most relevant to study microvascular loss and fibrosis respectively. We will use maximal 3 different ischemic time points in combination with 2 different reperfusion time points, a total of 6 groups, when the first 2 ischemia time points are not informative enough.

| Group | Ischemia time | Reperfusion time | Read out |
|---|---|---|---|
| 1 | 30 min | 2 days | IHC |
| 2 | 30 min | 14 days | IHC |
| 3 | 45 min | 2 days | IHC |
| 4 | 45 min | 14 days | IHC |

2) In this group, peripheral blood samples will be used for analysis of efficacy of treatment with Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor or FXII-inhibitor. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

| Group | Drug | Activity assay |
|---|---|---|
| 1 | Rivaroxaban | FXa chromogenic substrate |
| 2 | Dabigatran | PT |
| 3 | Platelet inhibitor | Aggregation assay |
| 4 | Antibody FXII | aPTT |

Main experiment:

Treatment groups based on unilateral I/R kidney injury:
1) placebo +IRI
2) Dabigatran +IRI
3) Rivaroxaban +IR
4) Platelet inhibitor +IRI
5) Rivaroxaban + Platelet inhibitor +IRI
6) FXIIa inhibitor + IRI
7) Isotype antibody

This classification will be used for every procedure, including the types of read out and reperfusion time.

| Procedure | Model | Reperfusion time | Read out |
|---|---|---|---|
| 1 | IRI | 15 min | Evans Blue (IHC*) |
| 2 | IRI | Day 2 | Evans Blue (IHC*) |
| 3 | IRI | Day 14 | Evans Blue (IHC*) |

*Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, we decide to combine Evans Blue and IHC staining unless the staining on pre-existing tissue slides could not be combined.

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

The following transgenic mouse strain will be used:

A transgenic mouse strain that expresses green-fluorescent protein (GFP) under the TIE-2 promotor to trace the ECs and Tomato-red fluorescent protein (RFP) under the NG2-promotor to trace pericytes.

Eight weeks old male mice will receive peri-operative analgesia after which unilateral renal IRI will be induced. This will be achieved by a midline laparotomy approach for the surgery with one incision allowing clamping of the renal pedicle to induce ischaemia of the kidney for 30 or 45 minutes, following reperfusion*. After verification of kidney colour to change back to red, the mice will be closed and adequate pain killing will be applied for 48 hr. Mice will be killed by terminal anaesthesia or under isoflurane anaesthesia receiving an i.v injection with 50 ul 1% Evans Blue solution in PBS, 20 min before the end of the perfusion time. In the Evans Blue group, 0.5 ml blood will be collected via a heart puncture and the animals will be bled via the right atrium and perfused with PBS via the left ventricle of the heart. Evans blue will be quantified in the blood and kidney of the mice. In all groups both kidneys will be excised, one as control and the other to examine Evans Blue- or protein staining*.
We will administer the following drugs in the intervention protocol: Dabigatran (anti-FIIa), Rivaroxaban (anti-FXa), platelet inhibitor, Rivaroxaban + platelet inhibitor, anti-FXIIa antibody, placebo or an isotype antibody. The drugs will be administered intravenously via vena jugularis 5 min after induction of ischemia in a 100 µl volume. After 15 min of reperfusion, the drugs will be applied a second time in the same way and dosages compared

to the first administration. Our collaborators in Maastricht found from older experiments that coagulation inhibitors showed a protective effect on the inflammatory responses after IRI with the highest effectiveness when administering the anticoagulants during the ischemic- and reperfusion period.

At 15 min and at day 2 and day 14 after kidney IRI, the mice will be sacrificed with terminal anaesthesia and bled after which tissue will be collected. The group of mice used for Evans Blue staining will be bled via a heart puncture.

*dependent on the outcome described in Figure 3.

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

Vascular IRI pilot group:
Based on LUMC DEC 13037: For the pilot group we will use 3 animals per group to make a decision on the best IRI-time. This is necessary to establish the minimal relevant difference by IRI with the least amount of mice for the intervention study.

Drug-dosage pilot group:
Based on MUMC 2014-036: Medication will be administered intravenously via the vena jugularis in a 100 µl volume (Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor and FXII-antibody) under anaesthesia and medication will be applied a second time 50 min after the first administration. After 30 min the mice will be killed and bled. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

Drug-intervention study:
Student's t-test results with a confidence interval of 5% ($\alpha=0.05$), and power capacity of 80% ($\pi=0.8$): $Z\alpha/2-Z\pi = (n/2)^{1/2} * (\mu1-\mu2)/\sigma$
Based on MUMC 2014-036: variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in reduction of rarefaction or in immunohistochemistry and protein parameters through administration of Dabigatran or Rivaroxaban, 9 animals are required for each group.

Microvascular leakage group:
Student's t-test results with a confidence interval of 5% ($\alpha=0.05$), and power capacity of 80% ($\pi=0.8$): $Z\alpha/2-Z\pi = (n/2)^{1/2} * (\mu1-\mu2)/\sigma$
Based on LUMC DEC 13037: the variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in microvascular leakage with a power of 0,8 and a P-value of 0,05%, 9 animals are required for each group.

Based on previous experiments, we expect a loss of 10% in animals (during experiments and tissue workup), therefore we would ask for 10 animals per read out-group.

**B. The animals**

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

Species: TIE2/NG2 male mix C57BL6/Agouti and FVB/N background at age of 8-12 weeks, breeding facilities of the LUMC.

Based on (a) the knowledge that male mice are more sensitive to kidney (IRI), (b) the female procedure of IRI is complex because the arteries of the ovary are in close proximity with the renal arteries and (c) based on experience from previous research we prefer male mice in our experiment.

Dependent on the outcome described in Figure 3-2 we select either 1 or 2 read out groups, calculation 1 or 2 will follow:

1)Unilateral + 2 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add maximal 2 groups extra is 18 animals.
Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.
Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 1x read out (Evans blue / IHC) , is 210 animals.
Total: 252 animals, maximal 280 animals.

2)Unilateral + 3 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add 3 animals if fibrosis is not confirmed at day 14 (2x) is 18 animals.
Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.
Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 2x read out (Evans blue / IHC) , is 420 animals.
Total: 462 animals, maximal 490 animals.

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

**D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement
The most significant task in this project is to obtain information of drug intervention at the stage of ischemia and reperfusion and their effect on microvascular rarefaction and leakage in vivo. At the moment we are working on new in vitro technologies to grow and visualize microvessels on a chip as a possible alternative for in vivo studies.
However, the effects on microvascular rarefaction in the kidney are complex and at this

moment the chip model is not yet compatible with the same physiological conditions. We want to look at microvascular rarefaction which is a process of ECs-PCs destabilisation and at this moment the chip contains solely ECs. Also, our proposed experiments cannot be performed in patients, since renal tissue is needed to examine the direct effect of drug administration on IRI microvascular rarefaction. Therefore, there is no alternative method. With regard to the selection for a murine model, we already performed these experiments – IRI in the kidney – in the mouse and could establish good techniques and interpretable results.

Reduction
The IRI operation will be performed by highly skilled and experienced staff, which will reduce intra-experimental variation and as such will result in fewer animals that will be needed per experiment to obtain reliable and statistically significant data. Furthermore we include in vitro and in vivo pilot studies in our proposal to delineate the number of animals needed for our research questions as precise as possible. Dependent on the outcome described in Figure 3 we might be able to reduce the number of animals in this project, by using the contralateral kidney as control and combine read out groups to obtain significant data.

Refinement
IRI surgery and drug administration will be performed under isoflurane anaesthesia. Pre- and post-operative analgesia will be administered to reduce the pain. If any of the animals develop any state described as humane endpoint, the animals will be humanely sacrificed, with an appropriate pentobarbital dose. Finally, experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. After surgery we provide the animals with solid and liquid chow in case they have difficulties chewing.

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

Animal suffering will be minimised where possible through the use of adequate anaesthesia and pain reduction. Any procedures will be carried out under complete anaesthesia. Following the procedures the animals will be receive adequate pain relief in order to decrease animal suffering as much as possible. The study is not expected to cause any adverse effects on the environment.

## Repetition and duplication

**E. Repetition**

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

n.v.t.

## Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

☒ No

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

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

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia and perioperative analgesia will be applied in all experiments.

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

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

The known adverse effect are drowsiness due to the analgesia after I/R kidney injury operation. Overall the animals behave normal after the surgery.

Explain why these effects may emerge.

Analgesia effect.

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

Accurate peri-analgesia anaesthesia administration will be performed by highly skilled and experienced staff.

**J. Humane endpoints**

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

☐ No > Continue with question K.

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

- In case of complications during or after surgery, direct euthanasia will be performed.

- Euthanasia will be performed on all animals suffering from disease or pain despite analgesia (within the experimental procedure or after the preparative surgery). Qualified staff and the project applicant will judge whether animals suffer from pain, based on experience and common sense. The experienced employees of the animal facility will also judge discomfort.

- We will set up a list to score and judge the severity of the following signs: Weakness, fur and nutritional problems, signs of infection (round back, non-movement, shaky).

- Animals will be removed from the experiments when they suffer from weight loss 15% of their body weight in 1-2 days.

- When the operation wound gets infected and lead to suffering or when the animals hurts itself euthanasia will be induced.

Indicate the likely incidence.

Based on experience with previous experiments the incidence is expected to be very low.

**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').

i.v injection drug under anaesthesia: mild
IRI under anaesthesia: Moderate; animals have to recover from anaesthesia.
Overall discomfort: 'moderate'

## End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

To analyse microvascular rarefaction using FACs sorted ECs and PCs, to stain for fibrosis in the kidney and to quantify leakage using Evans blue protocol mice need to be sacrificed.

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

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

☒ Yes

5.

# DEC-advies

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1160020171765

2. Titel van het project: The role of the coagulation system on microvascular rarefaction.

3. Titel van de NTS: De rol van stolling op het verlies van microvasculaire bloedvaatjes.

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: 01-06-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 01-06-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 15-06-2017 & 06-07-2017
   - ✓ anderszins behandeld: via emailronde
   - ✓ termijnonderbreking(en) 20-06-2017 t/m 28-06-2017 & 07-07-2017 t/m 08-07-2017.
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 28-06-2017 & 08-07-2017
   - ✓ advies aan CCD: 08-07-2017

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: 20-06-2017
   - Strekking van de gestelde vragen:
     De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de go/no-go momenten, vervanging, wettelijk vereist onderzoek en de bevoegdheid van het betrokken personeel.
   - Datum: 07-07-2017
   - Strekking van de gestelde vraag:
   - De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de begrenzing van de beschreven experimenten.
   - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages 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 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is duidelijk uitgewerkt. De verschillende subdoelen zijn uitkomstafhankelijk van elkaar en vormen een eenheid. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC 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 het bestuderen van componenten die leiden tot hypercoagulabiliteit en het effect van antistollings interventies en/of de remming van bloedplaatjes op vasculaire remodelling in een nier ischemie/reperfusie letsel model. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe moleculaire behandelingen voor patiënten met atriale fibrillatie (AF) en het voorkomen van de progressie en complicaties hiervan. 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. De rol van coagulatie in atriale fibrillatie is onlangs in eerder onderzoek aangetoond, echter is het mechanisme achter coagulatie geïnduceerde fibrose nog niet bekend. 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 identificeren van de optimale antistollingsbehandeling om zowel het risico op beroerte als de progressie van atriale fibrose tegen te gaan 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 en pijn ondervinden.
   Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen

inzicht verkrijgen in de rol van antistollingsfactoren op de stabiliteit van microvasculaire bloedplaatjes. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Het littekenweefsel dat ontstaat bij AF verstoord de geleiding wat leidt tot ritmestoornis en vice versa leidt fibrillatie tot littekenweefsel vorming, waardoor de ziekte progressief kan verlopen. Het tegengaan van dit verloop met specifieke antistolling voorkomt het progressieve verloop van de ziekte.

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 in samenwerking met nationale onderzoeksgroepen, allen met een erkende expertise. De onderzoeksgroep heeft veel onderzoek gedaan naar de link tussen het verlies van microvasculatuur en fibrose. Daarnaast heeft de onderzoeksgroep veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot het muismodel voor ischemie reperfusie letsel van de nier. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Daarnaast zijn er belangrijke 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 afwijkende huisvesting 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 het plaatsen van de osmotische minipomp, de immunisaties en de ontstekingen in het zenuwstelsel, inclusief de progressieve motorische problemen of periodieke verlammingen die hierdoor ontstaan, cumulatief maximaal matig ongerief zullen ervaren. 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 er een eenzijdige nier-IRI geïnduceerd worden. 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. Een chronisch AF muis model en imaging technieken op het kloppende hart van een muis zijn nog niet ontwikkeld. Ondanks dat er wel cardiale I/R modellen zijn die verschillende aspecten van het verlies van microvasculaire weergeven hebben deze modellen een lagere reproduceerbaarheid en minder mogelijkheden voor microvasculaire beeldvorming dan het niermodel. Er wordt op dit moment gewerkt aan nieuwe in vitro technologieën om microvessels op een chip te laten groeien en te visualiseren als een mogelijk alternatief voor in vivo studies. De effecten op microvasculaire verdunning in de nieren zijn echter complex en op dit moment is het chipmodel nog niet compatibel met dezelfde fysiologische omstandigheden. 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.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven door gebruik te maken van de contralaterale nier als controle en het combineren van uitleesgroepen om significante gegevens te verkrijgen. Daarnaast zal de IRI procedure uitgevoerd worden door zeer bekwaam personeel waardoor de intra-experimentele variatie zal verminderen en er minder dieren per experiment nodig zijn om betrouwbare en statistisch significante gegevens te verkrijgen. Naar inzien van de DEC zijn de beschreven go/no-go momenten realistisch, 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. Daarnaast worden na de operatie voer en solid drinks op de bodem van de bak aangeboden. 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 alleen gebruik maken van mannelijke muizen omdat deze gevoeliger zijn voor de nier IRI. Daarnaast is de IRI procedure bij vrouwelijke muizen veel complexer omdat de bloedvaten van de eierstok dicht bij de nieraders liggen. 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. Diverse weefsels zullen uit het dier gehaald moeten worden 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 bestuderen van componenten die leiden tot hypercoagulabiliteit en het effect van antistollings interventies en/of de remming van bloedplaatjes op vasculaire remodelling in een nier ischemie/reperfusie letsel model, met als uiteindelijke doel het ontwikkelen van nieuwe moleculaire behandelingen voor patiënten met atriale fibrillatie (AF) en het voorkomen van de progressie en complicaties hiervan, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het identificeren van de optimale antistollingsbehandeling om zowel het risico op beroerte als de progressie van atriale fibrose tegen te gaan.
   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.
   Atriale fibrillatie (AF) is een leeftijd gerelateerde aandoening die door de vergrijzing van de populatie steeds vaker voor zal komen. AF begint vaak onopgemerkt, waardoor het zich vrij kan ontwikkelen alvorens het wordt geconstateerd met alle nadelige gevolgen, zoals hartfalen en herseninfarct, van dien. Doordat AF een progressieve aandoening is wordt verwacht dat de kosten van de diagnostiek en behandeling van AF de komende decennia flink zullen toenemen Het progressieve verloop van de ziekte ontstaat door fibrose in de atria. Het fibrotische weefsel kan het fibrilleren opwekken en het fibrilleren leidt weer tot meer fibrose. De rol van coagulatie in atriale fibrillatie is onlangs in eerder onderzoek aangetoond, echter is het mechanisme achter coagulatie geïnduceerde fibrose nog niet bekend. De DEC acht het in kaart brengen van het effect van antistollingsremmers op micro vasculair verlies van essentieel belang voor het ontwikkelen van een antistollingsstrategie dat bij AF zowel de kans op een herseninfarct als fibrose van het hart op lange termijn tegen kan gaan. 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.

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> 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
AVD1160020171765

**Bijlagen**
2

Datum 24 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 augustus 2017. Het gaat om uw project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1160020171765. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

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

**Datum:**
24 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1160020171765

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**
24 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1160020171765

## 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: | NL11DEUT0451001400 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer: | LUMC |

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | PhD Student |
| Afdeling: | [redacted] |
| Telefoonnummer: | [redacted] |
| E-mailadres: | [redacted] |

**Datum:**
24 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1160020171765

**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 juni 2017 |
| Geplande einddatum: | 1 juni 2021 |
| Titel project: | The role of the coagulation system on microvascular rarefaction |
| Titel niet-technische samenvatting: | De rol van stolling op het verlies van microvasculaire vaatjes |
| Naam DEC: | DEC Leiden |
| Postadres DEC: | Postzone: [redacted] LUMC, Postbus 9600, 2300 RC Leiden |
| E-mailadres DEC: | [redacted] |

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | Gemandateerd vergunninghouder |
| Plaats: | Leiden |
| Datum: | 17 juli 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
AVD1160020171765

**Bijlagen**
2

Datum 24 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**
Factuurdatum: 24 augustus 2017
Vervaldatum: 23 september 2017
Factuurnummer: 171765

| **Omschrijving** | **Bedrag** |
|---|---|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1160020171765 | € 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.

7.

[redacted]

**Van:** [redacted]
**Verzonden:** woensdag 30 augustus 2017 10:00
**Aan:** info@zbo-ccd.nl
**Onderwerp:** FW: vraag bij de behandeling van AVD1160020171765
**Bijlagen:** aangepast appendix-description-animal-procedures-1.3 [redacted] 29082017.docx; aangepast 29082017 [redacted] 03_AVD1765_nts.docx

**Categorieën:** Dossier: [redacted]

Beste [redacted]
Bij deze ook de aangepaste NTS. Ik hoop u hiermee voldoende informatie te hebben gegeven anders hoor ik het graag.
Met vriendelijke groet,
[redacted]

**From:** [redacted]
**Sent:** dinsdag 29 augustus 2017 13:25
**To:** 'Info-zbo'
**Subject:** RE: vraag bij de behandeling van AVD1160020171765
Beste [redacted],
Bij deze heb ik de Appendix aangepast. Ik snap de verwarring ik heb de getallen aangepast naar de exacte berekeningen. We hebben het omhoog afgerond voor onverwacht uitval en had meegekregen dat dit kon.
Bedankt voor de feedback, ik wacht jullie advies verder af.
Met vriendelijke groet,
[redacted]

**From:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
**Sent:** dinsdag 29 augustus 2017 13:14
**To:** [redacted]
**Cc:** Instantie voor Dierenwelzijn (BEHDIV5)
**Subject:** vraag bij de behandeling van AVD1160020171765
Geacht mevrouw [redacted]
U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een vraag. Het betreft uw project: 'The role of the coagulation system on microvascular rarefaction'met aanvraagnummer AVD1160020171765.
De berekening van de dieraantallen is niet helemaal duidelijk; u geeft voor beide scenario's een exacte berekening, n=252 en n=462 maar u rond dit af naar n= 280 en n=490 maximaal. Waarom rekent u nog met extra dieren? Is er sprake van een uitvalspercentage?
Kunt u de dieraantallen verder verduidelijken en als het nodig is de bijlage dierproeven en de NTS aanpassen als de aantallen veranderen?
Uw aanvraag zal in de CCD vergadering van 15 september besproken worden. Totdat de antwoorden ontvangen zijn is de behandeltijd opgeschort,
Vriendelijke groet, [redacted]
Namens **Centrale Commissie Dierproeven**
**www.centralecommissiedierproeven.nl**
**.....**
**Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag**
**.....**
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

# 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'. | 11600 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | LUMC |
| 1.3 | List the serial number and type of animal procedure.<br><br>*Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.* | Serial number: 1<br>Type of animal procedure: Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model. |

## 2 Description of animal procedures

**A. Experimental approach and primary outcome parameters**

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

The well-established model of ischemia reperfusion (I/R) injury in the kidney will be used to determine the effect of the coagulation pathway in the process of microvascular rarefaction and leakage. The direct anti-coagulants (DOACs), dabigatran and rivaroxaban, platelet inhibitor and the FXII-inhibitor (antibody) are known to act on different levels of the coagulation cascade. Using these different agents in combination with the IRI model, makes it a highly suitable model to elucidate the role of the coagulation cascade on microvascular rarefaction.

We will include different animal groups related to the following read outs:

1) ECs and PCs will be quantified to determine microvascular loss. [IHC]

2) Fibrosis and the extent of kidney-injury will be quantified by staining of tissue sections with Sirius red and the kidney-injury-marker (KIM-1) respectively. [IHC]

3) Microvascular leakage will be visualized using a tracing protocol in which albumin that has leaked into extravascular spaces is stained with Evans Blue. [IHC]

Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, where we combine Evans Blue with IHC staining, we might combine read out 2 and 3 to lower the amount of animal groups when possible.

We would like to implement the following experimental setup:

Pilot groups:

1) To define the sensitivity of the project related transgenic mouse strains like TIE2/NG2 for I/R- induced microvascular loss and fibrosis, different ischemia- and reperfusion times will be tested. This pilot study will be used to choose the best I/R time for the other experiments in this Appendix. The mice will be sacrificed at day 2 (n=3) and day 14 (n=3), based on experience these time points are most relevant to study microvascular loss and fibrosis respectively. We will use maximal 3 different ischemic time points in combination with 2 different reperfusion time points, a total of 6 groups, when the first 2 ischemia time points are not informative enough.

| Group | Ischemia time | Reperfusion time | Read out |
|---|---|---|---|
| 1 | 30 min | 2 days | IHC |
| 2 | 30 min | 14 days | IHC |
| 3 | 45 min | 2 days | IHC |
| 4 | 45 min | 14 days | IHC |

2) In this group, peripheral blood samples will be used for analysis of efficacy of treatment with Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor or FXII-inhibitor. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

| Group | Drug | Activity assay |
|---|---|---|
| 1 | Rivaroxaban | FXa chromogenic substrate |
| 2 | Dabigatran | PT |
| 3 | Platelet inhibitor | Aggregation assay |
| 4 | Antibody FXII | aPTT |

Main experiment:

Treatment groups based on unilateral I/R kidney injury:
1) placebo +IRI
2) Dabigatran +IRI
3) Rivaroxaban +IR
4) Platelet inhibitor +IRI
5) Rivaroxaban + Platelet inhibitor +IRI
6) FXIIa inhibitor + IRI
7) Isotype antibody

This classification will be used for every procedure, including the types of read out and reperfusion time.

| Procedure | Model | Reperfusion time | Read out |
|---|---|---|---|
| 1 | IRI | 15 min | Evans Blue (IHC*) |
| 2 | IRI | Day 2 | Evans Blue (IHC*) |
| 3 | IRI | Day 14 | Evans Blue (IHC*) |

*Based on the outcome of the staining of pre-existing tissue slides, we decide to combine Evans Blue and IHC staining unless the staining on pre-existing tissue slides could not be combined.

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

The following transgenic mouse strain will be used:

A transgenic mouse strain that expresses green-fluorescent protein (GFP) under the TIE-2 promotor to trace the ECs and Tomato-red fluorescent protein (RFP) under the NG2-promotor to trace pericytes.

Eight weeks old male mice will receive peri-operative analgesia after which unilateral renal IRI will be induced. This will be achieved by a midline laparotomy approach for the surgery with one incision allowing clamping of the renal pedicle to induce ischaemia of the kidney for 30 or 45 minutes, following reperfusion*. After verification of kidney colour to change back to red, the mice will be closed and adequate pain killing will be applied for 48 hr. Mice will be killed by terminal anaesthesia or under isoflurane anaesthesia receiving an i.v injection with 50 ul 1% Evans Blue solution in PBS, 20 min before the end of the perfusion time. In the Evans Blue group, 0.5 ml blood will be collected via a heart puncture and the animals will be bled via the right atrium and perfused with PBS via the left ventricle of the heart. Evans blue will be quantified in the blood and kidney of the mice. In all groups both kidneys will be excised, one as control and the other to examine Evans Blue- or protein staining*.
We will administer the following drugs in the intervention protocol: Dabigatran (anti-FIIa), Rivaroxaban (anti-FXa), platelet inhibitor, Rivaroxaban + platelet inhibitor, anti-FXIIa antibody, placebo or an isotype antibody. The drugs will be administered intravenously via vena jugularis 5 min after induction of ischemia in a 100 µl volume. After 15 min of reperfusion, the drugs will be applied a second time in the same way and dosages compared

to the first administration. Our collaborators in Maastricht found from older experiments that coagulation inhibitors showed a protective effect on the inflammatory responses after IRI with the highest effectiveness when administering the anticoagulants during the ischemic- and reperfusion period.

At 15 min and at day 2 and day 14 after kidney IRI, the mice will be sacrificed with terminal anaesthesia and bled after which tissue will be collected. The group of mice used for Evans Blue staining will be bled via a heart puncture.

*dependent on the outcome described in Figure 3.

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

Vascular IRI pilot group:
Based on LUMC DEC 13037: For the pilot group we will use 3 animals per group to make a decision on the best IRI-time. This is necessary to establish the minimal relevant difference by IRI with the least amount of mice for the intervention study.

Drug-dosage pilot group:
Based on MUMC 2014-036: Medication will be administered intravenously via the vena jugularis in a 100 µl volume (Dabigatran, Rivaroxaban, platelet inhibitor and FXII-antibody) under anaesthesia and medication will be applied a second time 50 min after the first administration. After 30 min the mice will be killed and bled. If the appropriate decrease in activity can be achieved in 6 mice, the experiment can be regarded as successful.

Drug-intervention study:
Student's t-test results with a confidence interval of 5% ($\alpha=0.05$), and power capacity of 80% ($\pi=0.8$): $Z\alpha/2-Z\pi = (n/2)^{1/2} * (\mu1-\mu2)/\sigma$
Based on MUMC 2014-036: variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in reduction of rarefaction or in immunohistochemistry and protein parameters through administration of Dabigatran or Rivaroxaban, 9 animals are required for each group.

Microvascular leakage group:
Student's t-test results with a confidence interval of 5% ($\alpha=0.05$), and power capacity of 80% ($\pi=0.8$): $Z\alpha/2-Z\pi = (n/2)^{1/2} * (\mu1-\mu2)/\sigma$
Based on LUMC DEC 13037: the variation coefficient is 20% and to detect a 25% difference in microvascular leakage with a power of 0,8 and a P-value of 0,05%, 9 animals are required for each group.

Based on previous experiments, we expect a loss of 10% in animals (during experiments and tissue workup), therefore we would ask for 10 animals per read out-group.

**B. The animals**

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

Species: TIE2/NG2 male mix C57BL6/Agouti and FVB/N background at age of 8-12 weeks, breeding facilities of the LUMC.

Based on (a) the knowledge that male mice are more sensitive to kidney (IRI), (b) the female procedure of IRI is complex because the arteries of the ovary are in close proximity with the renal arteries and (c) based on experience from previous research we prefer male mice in our experiment.

Dependent on the outcome described in Figure 3-2 we select either 1 or 2 read out groups, calculation 1 or 2 will follow:

1)Unilateral + 2 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add maximal 2 groups extra is 18 animals.
Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.
Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 1x read out (Evans blue / IHC) , is 210 animals.
Total: 252 animals.

2)Unilateral + 3 read out groups: Pilot kidney IRI group (n=3), 2x ischemia (30 or 45min), 2x reperfusion (2 and 14 days), add 3 animals if fibrosis is not confirmed at day 14 (2x) is 18 animals.
Pilot group dosage finding (n=6), 4x treatment is 24 animals.
Main study (n=10), 7x different administration, 3x time point (15min, 2 or 14 days), 2x read out (Evans blue / IHC) , is 420 animals.
Total: 462 animals.

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

☒ No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

**D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement
The most significant task in this project is to obtain information of drug intervention at the stage of ischemia and reperfusion and their effect on microvascular rarefaction and leakage in vivo. At the moment we are working on new in vitro technologies to grow and visualize microvessels on a chip as a possible alternative for in vivo studies.
However, the effects on microvascular rarefaction in the kidney are complex and at this

moment the chip model is not yet compatible with the same physiological conditions. We want to look at microvascular rarefaction which is a process of ECs-PCs destabilisation and at this moment the chip contains solely ECs. Also, our proposed experiments cannot be performed in patients, since renal tissue is needed to examine the direct effect of drug administration on IRI microvascular rarefaction. Therefore, there is no alternative method. With regard to the selection for a murine model, we already performed these experiments – IRI in the kidney – in the mouse and could establish good techniques and interpretable results.

Reduction
The IRI operation will be performed by highly skilled and experienced staff, which will reduce intra-experimental variation and as such will result in fewer animals that will be needed per experiment to obtain reliable and statistically significant data. Furthermore we include in vitro and in vivo pilot studies in our proposal to delineate the number of animals needed for our research questions as precise as possible. Dependent on the outcome described in Figure 3 we might be able to reduce the number of animals in this project, by using the contralateral kidney as control and combine read out groups to obtain significant data.

Refinement
IRI surgery and drug administration will be performed under isoflurane anaesthesia. Pre- and post-operative analgesia will be administered to reduce the pain. If any of the animals develop any state described as humane endpoint, the animals will be humanely sacrificed, with an appropriate pentobarbital dose. Finally, experiments will be performed by staff that are highly skilled and experienced with animal handling. After surgery we provide the animals with solid and liquid chow in case they have difficulties chewing.

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

Animal suffering will be minimised where possible through the use of adequate anaesthesia and pain reduction. Any procedures will be carried out under complete anaesthesia. Following the procedures the animals will be receive adequate pain relief in order to decrease animal suffering as much as possible. The study is not expected to cause any adverse effects on the environment.

## Repetition and duplication

**E. Repetition**

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

n.v.t.

## Accommodation and care

**F. Accommodation and care**

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

☒ No

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

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

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia and perioperative analgesia will be applied in all experiments.

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

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

The known adverse effect are drowsiness due to the analgesia after I/R kidney injury operation. Overall the animals behave normal after the surgery.

Explain why these effects may emerge.

Analgesia effect.

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

Accurate peri-analgesia anaesthesia administration will be performed by highly skilled and experienced staff.

**J. Humane endpoints**

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

☐ No > Continue with question K.

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

- In case of complications during or after surgery, direct euthanasia will be performed.

- Euthanasia will be performed on all animals suffering from disease or pain despite analgesia (within the experimental procedure or after the preparative surgery). Qualified staff and the project applicant will judge whether animals suffer from pain, based on experience and common sense. The experienced employees of the animal facility will also judge discomfort.

- We will set up a list to score and judge the severity of the following signs: Weakness, fur and nutritional problems, signs of infection (round back, non-movement, shaky).

- Animals will be removed from the experiments when they suffer from weight loss 15% of their body weight in 1-2 days.

- When the operation wound gets infected and lead to suffering or when the animals hurts itself euthanasia will be induced.

Indicate the likely incidence.

Based on experience with previous experiments the incidence is expected to be very low.

**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').

i.v injection drug under anaesthesia: mild
IRI under anaesthesia: Moderate; animals have to recover from anaesthesia.
Overall discomfort: 'moderate'

## End of experiment

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

To analyse microvascular rarefaction using FACs sorted ECs and PCs, to stain for fibrosis in the kidney and to quantify leakage using Evans blue protocol mice need to be sacrificed.

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

9.

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
AVD1160020171765
**Bijlagen**
1

Datum 18 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 22 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction" met aanvraagnummer AVD1160020171765. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 30 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd de dieraantallen toe te lichten. U heeft bijlage 3.4.4.1 en de NTS aangepast.

**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 "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction" starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 september 2017 tot en met 1 juni 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 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

[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 Ziekenhuis Leiden |
| Adres: | Postbus 9600 |
| Postcode en plaats: | 2300 RC LEIDEN |
| Deelnemersnummer: | 11600 |

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 september 2017 tot en met 1 juni 2021, voor het project "The role of the coagulation system on microvascular rarefaction" met aanvraagnummer AVD1160020171765, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD Student.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 juli 2017, ontvangen op 22 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 30 augustus 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---|---|---|
| **3.4.4.1 Inhibition of coagulation components in a kidney ischemic reperfusion injury model.** | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 462 | 100% Matig | |

**Voorwaarden**

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

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

**Aanvraagnummer:**
AVD1160020171765

# 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.

1767

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* 10612

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

| | |
|---|---|
| Naam instelling of organisatie | Universiteit Leiden |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [redacted] |
| KvK-nummer | 27 36 89 29 |

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 | Rapenburg | 70 |
| Postbus | 9502 | |
| Postcode en plaats | 2300 RA | Leiden |
| IBAN | [redacted] | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Leiden / Faculteit W&N | |

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

| | |
|---|---|
| (Titel) Naam en voorletters | |
| 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<br>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<br>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
| 2.2 | Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is? | ☐ 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? | Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem |
| 3.4 | Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt? | Naam DEC: [redacted] |
| | | Postadres: [redacted] LUMC<br>Postbus 9600<br>2300 RC Leiden |
| | | 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 | Gemandateerd vergunninghouder |
| Plaats | Leiden |
| Datum | - 25-7-2017 |
| 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. | 10612 |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Leiden |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem |

## 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.

De zebravis is een wetenschappelijk belangrijk modelorganisme voor onderzoek naar humane ziekten. [redacted]. Als modelorganisme biedt de zebravis een aantal specifieke voordelen ten opzichte van bijvoorbeeld de muis, waardoor nieuwe inzichten kunnen worden verkregen. De externe ontwikkeling en optische transparantie van de zebravisembryo's maken dit model bij uitstek geschikt voor de bestudering (en experimentele manipulatie) van vroege ontwikkelingsaspecten van immuniteit. Hierbij worden embryo's en larven gebruikt die zich nog niet zelfstandig voeden (tot maximaal 5 dagen na bevruchting; geen proefdieren volgens richtlijn 2010/63/EU). Tijdens de ontwikkeling van het zebravisembryo zijn de twee componenten van het immuunsysteem, de aangeboren immuniteit (innate immunity, met macrofagen en neutrofielen als belangrijkste celtypen) en de verworven immuniteit (adaptive immunity, afhankelijk van T- en B-cellen), niet meteen beide actief. De macrofagen en neutrofielen (innate immunity) functioneren al vanaf de eerste dag van de ontwikkeling, terwijl T- en B-cel-functies pas na enkele weken volledig ontwikkeld zijn. Het zebravisembryomodel is daarom een geschikt in vivo model om specifiek de functie van het aangeboren immuunsysteem te onderzoeken ([redacted]). Omdat de genetische componenten van het immuunsysteem tussen zebravis en andere vertebraten in grote mate geconserveerd zijn, biedt het gebruik van de zebravis als modelsysteem voor immuniteit een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere vertebraten onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. De zebravisonderzoeksgemeenschap heeft daarom in de afgelopen jaren zwaar geïnvesteerd in de ontwikkeling van tal van transgene lijnen waarin de verschillende celtypen van het immuunsysteem of onderdelen daarvan fluorescent gelabeld zijn en transgene lijnen die fluorescente reportergenen bevatten waarmee de activatie van verschillende componenten van de immuunrespons kan worden gevisualiseerd. Met behulp van deze transgene lijnen kan de interactie van immuuncellen met pathogenen (in infectiemodellen) of met kankercellen (in tumorimplantatiemodellen) zeer gedetailleerd bestudeerd worden. De zebravisembryo's zijn bovendien erg geschikt voor het ontwikkelen van nieuwe methoden voor drug screening. Bij onderzoek naar de genoemde immuun-gerelateerde ziekten zijn mutanten voor belangrijke genen van het immuunsysteem onmisbaar. Bovendien is het belangrijk om transgene modellen voor deze immuun-gerelateerde ziekten te ontwikkelen. Genetische modificatie van zebravissen vindt plaats middels injectie van DNA of RNA (CRISPR-technologie) in extern bevruchte embryo's (zygoten) en is geen dierproef in de zin van de Wet. Echter, de fok wordt vergunningplichtig (fok met ongerief) als er bij monitoring t/m de F2-generatie sprake blijkt te zijn van een aangetast fenotype. In vergelijking met de muis, waarbij al zeer veel knockout-mutanten en transgene modellen gebruikt worden, zijn er voor de zebravis nog weinig mutanten en transgene modellen voor immuungenen beschreven. Dit project draagt bij aan de ontwikkeling hiervan t.b.v de onder punt 3.2 genoemde onderzoeksdoelen en t.b.v. uitwisseling met de internationale onderzoeksgemeenschap.

**3.2 Doel**

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit onderzoek is het maken van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravismodellen om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen. Hiermee verwachten wij nieuwe inzichten te kunnen verkrijgen in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan stress- en immuun-gerelateerde ziekten, waaronder infectieziekten, ontstekingsziekten, metabole ziekten (zoals diabetes) en kanker. Een

beter begrip van deze mechanismen zal mogelijk leiden tot de identificatie van targets (doelwitgenen) voor nieuwe therapeutische strategieën.

De haalbaarheid van dit projectvoorstel is gewaarborgd door de expertise van de betrokken onderzoekers en dierverzorgers alsmede door uitstekende faciliteiten en de benodigde financiering voor het onderzoek. [redacted]. Om up-to-date te blijven en ervaringen uit te wisselen bezoeken zij ook regelmatig andere faciliteiten en congressen over de kweek van zebravissen. Binnen de zebravisonderzoeksgemeenschap is er nauwe samenwerking waardoor wij goed op de hoogte zijn van het onderzoek dat bij andere instituten wordt uitgevoerd. [redacted]). Onze samenwerkingspartners werken met infectiemodellen voor andere pathogenen of aan andere immuungerelateerde ziekten en onderzoeksvragen zodat er een wederzijds voordeel is om genetisch gemodificeerde zebravislijnen tussen instituten uit te wisselen en de constructie ervan niet te dupliceren. Zebravislijnen kunnen eenvoudig geïmporteerd of geëxporteerd worden door het opsturen van embryo's. [redacted].

**3.3 Belang**

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

Bij infectieziekten, ontstekingsziekten, kanker, en diverse andere ziekten speelt het immuunsysteem een grote rol. Het zebravismodel biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van deze ziekten in meerdere stadia van immuniteit (zowel tijdens de ontwikkeling als bij een volledig ontwikkeld immuunsysteem), waarbij gebruik gemaakt kan worden van transgene vissen met fluorescent gemarkeerde immuuncellen en van collecties van mutanten voor genetisch onderzoek ([redacted] Op het gebied van infectieziekten heeft de zebravis met name in tuberculose-onderzoek de meerwaarde al laten zien ([redacted]). Het gebruik van zebravisembryo's heeft tot belangrijke nieuwe inzichten geleid in de rol van macrofagen en neutrofielen bij de vorming van granulomen, de kenmerkende structuren waarin tuberculose-verwekkende bacteriën in hun gastheer kunnen overleven. Tuberculose staat hoog op de prioriteitenlijst van de WHO (1/3 van de wereldbevolking is besmet en jaarlijks zijn er 1.5 miljoen doden). De opkomst van multidrug-resistente stammen maakt het extra belangrijk om beter inzicht te krijgen in de mechanismen waarmee deze pathogeen aan het immuunsysteem kan ontsnappen en om nieuwe screeningsmethoden voor anti-tuberculose drugs te ontwikkelen. [redacted] Nieuwe therapieën tegen tuberculose zijn hard nodig omdat er steeds vaker antibioticum-resistenties optreden en er nog altijd geen goed vaccin is. Stoffen die de eigen afweer stimuleren zouden in combinatie met antibiotica kunnen worden toegepast. [redacted]. Het zebravisembryomodel biedt ook nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van de interacties tussen kankercellen en het immuunsysteem. [redacted]). Mutanten in centrale genen van het

immuunsysteem en transgenenmodellen zijn belangrijke onderzoeksobjecten die helpen om meer inzicht te krijgen in de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de functie van immuuncellen en de pathologie van immuun-gerelateerde ziekten. Dit onderzoek wordt uitgevoerd in grotere Nederlandse en Europese samenwerkingsverbanden die kennisoverdracht en kennisbenutting bevorderen.

[redacted] Deze TLR-eiwitten spelen een cruciale rol bij de herkenning van pathogenen door het aangeboren immuunsysteem en defecten in deze genen en hun onderliggende signaalroutes hebben belangrijke relaties tot infectieziekten, ontstekingsziekten, auto-immuunziekten zoals reuma en asthma, en kanker (Nobelprijs voor geneeskunde in 2011). Myd88 is een adaptoreiwit dat wordt gerecruteerd door bijna alle Toll-like receptoren (de uitzondering is TLR3 betrokken bij herkenning van virussen) na herkenningen van pathogenen of andere signalen. Myd88 geeft het signaal vervolgens door aan eiwitkinases en uiteindelijk resulteert dit in de activatie van centrale transcriptiefactoren die de immuunrespons reguleren. Recent is gebleken dat autofagie een belangrijk proces is dat door TLR-Myd88 signaling wordt gereguleerd. [redacted]. De activering van Dram1 is deels afhankelijk van Myd88, maar het is nog onbekend welke andere signaalroutes van het immuunsysteem Dram1 kunnen activeren. Ook het moleculaire werkingsmechanisme van Dram1 is nog onbekend . Een beter begrip van zowel de activatie- als de werkingsmechanismen is belangrijk voor het onderzoek naar Dram1 als een potentieel drug target. [redacted] Gezien de reeds genoemde onderzoekstechnische voordelen van het zebravismodel-systeem kunnen studies in dit organisme nieuwe inzichten verschaffen over het immuunsysteem van vertebraten en de connecties tussen autofagie, tuberculose en diabetes.

**3.4 Onderzoeksstrategie**

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

[redacted]. Hiermee is de basis gelegd voor de selectie van kandidaatgenen voor de constructie van genetisch gemodificeerde zebravislijnen t.b.v. functioneel onderzoek. Bij de keuzes die wij hierin maken spelen literatuurstudie (zoals informatie over genetische associaties met humane ziekten) en onze eerdere onderzoekresultaten tevens een belangrijke rol. [redacted]). Deze myd88-mutant heeft een defect in de signaalroute (Toll-like receptor signaling) die essentieel is voor de herkenning van en reactie op micro-organismen of op lichaamseigen signaalstoffen die tijdens een infectie of in de omgeving van tumoren geproduceerd worden. Ons onderzoek naar deze mutant heeft geleid tot een belangrijke nieuw inzicht in de afweer tegen infecties. [redacted] Autofagie betekent “zelf eten” en is al heel lang bekend als een mechanisme dat cellen gebruiken om verouderde of kapotte onderdelen op te ruimen en om energie vrij te maken onder stress. Pas vrij recent is duidelijk geworden dat autofagie ook een zeer belangrijke rol speelt in het immuunsysteem en momenteel staat deze anti-bacteriële functie van autofagie enorm in de belangstelling. Het was al bekend dat Dram1 een rol speelt bij autofagie na DNA-schade, vandaar de naam: DNA-damage regulated autophagy modulator. Bovendien was er al aandacht voor de rol van Dram1 in kanker. [redacted] willen wij zebravislijnen gebruiken met genetische modificaties in Dram1 of andere componenten van de autofagiemachinerie die samenwerken met Dram1. Bij dit onderzoek zal ook de myd88-mutant gebruikt blijven worden alsmede andere lijnen met genetische modificaties in signaalroutes die betrokken zijn bij herkenning van pathogenen en het activeren van afweermechanismen waaronder autofagie. Autofagie speelt ook een

belangrijke rol in de pathogenese van metabole ziekten (zoals diabetes), ontstekingsziekten en kanker. Patiënten met dergelijke ziekten zijn ook vaak gevoeliger voor infecties. Bijvoorbeeld, diabetes-patiënten hebben een 3x groter kans om tuberculose te krijgen [redacted]). Tuberculose is een door mycobacteriën veroorzaakte infectieziekte [redacted] Wij willen daarom ook zebravismutanten onderzoeken in immuungenen die geassocieerd zijn met zowel diabetes als tuberculose.

Voor functioneel onderzoek naar de signaalroutes betrokken bij het immuunsysteem is het vaak nodig om deze routes zowel te inhiberen (door genen in de route te muteren – "loss-of-function") als te activeren (door genen in de route tot overexpressie te brengen – "gain of function"). Hiervoor worden verschillende genetisch gemodificeerde zebravislijnen gebruikt die op de volgende wijzen verkregen worden:

1) Import vanuit een stockcentrum of ander onderzoeksinstituut
2) CRISPR/Cas-mutagenese, gebaseerd op de injectie van RNA in het 1-cellige stadium (zygote) van zebravisembryo's. Deze mutagenesetechniek wordt eventueel gecombineerd met homologe recombinatie om een specifieke variant van een gen of een fluorescente merker in het genoom te introduceren. De eerste generatie van vissen (F0) die met deze techniek gegenereerd wordt is mozaïek voor de mutatie. Deze worden gekruist tegen wildtype om stabiele lijnen te genereren die de mutatie aan de nakomelingen overdragen.
3) Transgenese, gebaseerd op de injectie van DNA in het 1-cellige stadium (zygote) van zebravisembryo's. Deze techniek wordt gebruikt om zebravismodellen te genereren de overexpressie van kandidaatgenen. Hierbij worden induceerbare overexpressiesystemen gebruikt (zoals Gal4, Cre of heat shock promoter) zodat de overexpressie specfiek geïnduceerd kan worden in de embryo's/larven waarmee experimenten worden uitgevoerd om de immuunafweer te bestuderen. Daarom valt met deze technieken in principe geen fenotype bij de volwassen vissen te verwachten. Transgenese wordt tevens gebruikt voor het genereren van fluorescente reporterlijnen (merkers voor activering van genen betrokken bij de immuunrespons). De eerste generatie van transgene vissen (F0) is mozaïek voor het transgen. Deze worden gekruist tegen wildtype om stabiele lijnen te genereren die het transgen aan de nakomelingen overdragen.
4) Kruisingen van verschillende mutanten en transgene lijnen. Voor de functionele analyse van een specifieke signaalroute kan het nodig zijn om meerdere genen uit te schakelen. Het zou bijvoorbeeld kunnen dat een essentiële regulator wordt gecodeerd door meerdere isovormen die voor elkaars functie kunnen compenseren. In dat geval worden er meervoudige mutanten) gemaakt door de lijnen met enkelvoudige mutaties te kruisen. Ook worden mutanten gekruist met fluorescente reporterlijnen (merkers voor immuunceltypen of activering van genen betrokken bij de immuunrespons).

Er worden onder dit projectvoorstel geen experimenten uitgevoerd met vrijzwemmende larven of volwassen zebravissen van bovengenoemde genetisch gemodificeerde lijnen; de lijnen worden uitsluitend gebruikt voor de productie van embryo's t.b.v. experimenten waarvan het eindpunt op maximaal 5 dagen na bevruchting ligt. Het gaat hier dus alleen om de constructie van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen (waarbij een aantal dieren wordt gedood t.b.v. fenotypering) en de reguliere kweek van vissen waarbij sommige lijnen mogelijk vanwege een zwakker immuunsysteem vatbaarder zijn voor infecties. In een aquarium is het onvermijdelijk dat de vissen in aanraking komen met verschillende microorganismen die in het water leven. Bacteriële filters zijn immers noodzakelijk voor het opruimen van de afvalstoffen van de vissen en dus een belangrijke bepalende factor voor de waterkwaliteit en het algemene welzijn van de vissen. Tussen de bacteriële filters en toestroom van het water naar de aquariumbakken zit een UV-filter waarmee de groei van ongewenste microorganismen in het water zoveel mogelijk wordt beperkt, maar dit geheel voorkomen is onmogelijk. De vissen worden dagelijks op gezondheid gecontroleerd door de dierverzorgers en zij zullen de dieren euthanaseren indien hier aanleiding toe is (humane eindpunten).

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

Dit project betreft de constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief (volgnummer 3.4.4.1). Deze lijnen worden gebruikt om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen

infecties. Deze experimenten worden beëindigd voordat de larven het stadium bereiken waarbij zij zich zelfstandig kunnen voeden (5 dagen na bevruchting). De fok van de genetisch gemodificeerde lijnen die voor de productie van embryo's nodig zijn zal in sommige gevallen gepaard kunnen gaan met ongerief. De uitschakeling van genen van het aangeboren immuunsysteem kan namelijk leiden tot een verhoogde vatbaarheid voor infecties. Het is belangrijk om hierbij op te merken dat de mutaties die wij introduceren niet tot een algehele immuundeficiëntie zullen leiden. Vissen hebben namelijk net als de mens zowel een aangeboren immuunsysteem (afhankelijk van de activiteit van fagocyten, zoals macrofagen en neutrofielen) als een adaptief immuunsysteem (afhankelijk van T- en B-cellen). Het adaptieve immuunsysteem ontwikkelt zich tussen de periode van 5 dagen en 3 weken na bevruchting, dus juveniele en volwassen vissen die wij kweken hebben wel bescherming van het adaptieve immuunsysteem. Wij verwachten dat de mutaties die wij willen bestuderen slechts in enkele gevallen tot een verhoogde uitval bij de kweek zullen leiden. Er is namelijk veel redundantie in het immuunsysteem waardoor een mutatie in een bepaald gen deels of geheel gecompenseerd kan worden door andere genen met een parallele functie. Het is daarom waarschijnlijk dat in er in de meeste gevallen geen effect van de mutatie wordt gevonden tijdens de reguliere kweek en dat een immuun-gerelateerd fenotype pas gedetecteerd wordt tijdens infectie-experimenten met de embryo's van deze lijnen. Lijnen met een mutatie in een enkele Toll-like receptor ([redacted]) of bijvoorbeeld in een TLR-adaptor ([redacted] die alleen bij de tlr2-afhankelijke signaalroute betrokken is vertonen geen verschillen in de kweek in vergelijking met wild type vissen. Ook hebben wij geen ongerief geconstateerd bij verschillende mutanten in genen die betrokken zijn bij de afweer middels autofagie [redacted]) of bij mutanten in genen die betrokken is bij chemokinesignaling ([redacted]. Voor nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen zal door monitoring van het welzijn over twee generaties beoordeeld worden of er sprake is van fok met ongerief. Ook bestaande lijnen die door import worden verkregen zullen over twee generaties in onze faciliteit gemonitord worden. De monitoring bestaat uit een dagelijkse controle op symptomen van ziekte (zoals openstaande schubben, afwijkend zwemgedrag, huidlaesies) en vergelijking van de overlevingspercentages tussen gemodificeerde lijnen en wild type controles. Indien er redenen zijn om aan te nemen dat een genetische modificatie tot een fenotype zou kunnen leiden, dan zal een beperkt aantal van de fokdieren worden gedood voor nadere karakterisering van het effect van de mutatie (bijvoorbeeld middels RNA-sequencing en profiling van eiwitten en metabolieten). Voor genotypering van de lijnen wordt vinknippen toegepast (afknippen van stukje van de staartvin wat zich weer herstelt door regeneratie).

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De selectie van kandidaatgenen voor genetische modificatie wordt gebaseerd op literatuurstudie en eerder onderzoek zoals beschreven onder 3.2. Bij elke nieuwe genetisch gemodificeerde lijn zal moeten worden bepaald of deze dieren geschikt zijn voor het onderzoek naar het immuunsysteem en of er sprake is van fok met ongerief. Vissen die ernstige afwijkingen vertonen (bijvoorbeeld abnormaal zwemgedrag) zijn niet bruikbaar voor immunologisch onderzoek en zullen worden gedood (humaan eindpunt). Tevens zijn lijnen met een ernstige verminderde fertiliteit ongeschikt voor het onderzoek, aangezien hiervoor efficiënte productie van embryo's noodzakelijk is.

Om te bepalen of een mutant homozygoot gefokt kan worden zullen de embryo's/larven afkomstig van een kruising van heterozygote ouders eerst tijdens de eerste 5 dagen van de ontwikkeling worden gevolgd. Als tijdens deze periode geen verminderde overlevering of ontwikkelingsafwijkingen worden geconstateerd, dan zullen de dieren verder opgekweekt worden tot volwassenheid en zal op een leeftijd van 2-3 maanden een genotypering worden uitgevoerd via vinknippen. Bij afwijking van Mendelische segregatie (minder dan 25% homozygote dieren) is het aannemelijk dat de homozygote mutanten een verminderde levensvatbaarheid hebben en zal de verdere fok van homozygote dieren beschouwd worden

als fok met ongerief. Ook als er geen afwijking is van Mendelische segregatie zullen de lijnen nog verder gemonitord worden door dagelijks gecontroleerd worden op symptomen van ziekte (zoals openstaande schubben, afwijkend zwemgedrag, huidlaesies). Indien er bij een genetisch gemodificeerde lijnen vaker uitval door ziekte optreedt dan bij de corresponderende wild type lijn zal de verdere fok beschouwd worden als fok met ongerief. Zoals beschreven onder 3.4.2 verwachten wij dat dit slechts in enkele gevallen van toepassing zal zijn, [redacted]. Bij overexpressie van immuungenen worden induceerbare expressiesystemen gebruikt zodat geen fenotypen te verwachten zijn, maar zal desondanks ook dezelfde monitoring plaatsvinden als bij mutanten. In geval van fok met ongerief worden de dieren zoveel mogelijk als heterozygote lijnen aangehouden en alleen in periodes dat er veel embryo's nodig zijn voor experimenten zullen er kleine families van homozygote vissen worden gekweekt (20-50, afhankelijk van de behoefte). Deze families zullen worden gekweekt tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar, aangezien bij oudere vissen de kans op ziekte door infecties toeneemt (i.p.v. 2 jaar zoals gebruikelijk bij de reguliere fok i.v.m. verminderde fertiliteit na deze leeftijd) .

N.B. Kweek met ongerief [redacted] en constructie van CRISPR-mutanten worden momenteel uitgevoerd onder een eerder goedgekeurde DEC-protocol (Kweek van zebravismutanten voor onderzoek naar het immuunsysteem) dat loopt t/m 31/12/2017. Wanneer een vergunning voor dit project is verkregen, zal vanaf 1/1/2018 de kweek van de myd88-mutant en de constructie van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravislijnen worden voortgezet onder deze nieuwe vergunning.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|---|---|
| 1 | Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief |
| 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 | De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem |
| 1.2 | Looptijd van het project | 1-1-2018 t/m 31-12-2022 |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | afweermechanismen, aangeboren immuniteit, infectie, ontsteking, genetische modificatie |

## 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)

Het doel van dit onderzoek is het maken van genetisch gemodificeerde zebravismodellen voor onderzoek naar de functie van het aangeboren immuunsysteem bij infectieziekten en andere immuungerelateerde ziekten, waaronder ontstekingsziekten, metabole ziekten (zoals diabetes) en kanker. Het immuunsysteem van de zebravis vertoont grote overeenkomsten met dat van de mens. De zebravisembryo's zijn zeer geschikt voor microcopische onderzoek, omdat deze zich buiten de moeder ontwikkelen en doorzichtig zijn. Door de immuuncellen met fluorescerende kleuren te markeren kan de rol bij ziekteprocessen zeer gedetailleerd bestudeerd worden. Bovendien bestaan er relatief eenvoudige genetische technieken voor functioneel onderzoek naar genen betrokken bij immuunreacties.

| | | |
|---|---|---|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Het onderzoek levert fundamenteel wetenschappelijke kennis op die belangrijk is om infectieziekten en andere immuungerelateerde ziekten beter te begrijpen in mensen en zodoende aanknopingspunten te vinden voor nieuwe behandelingsstategieën. Het wordt uitgevoerd in (inter)nationale samenwerkingsverbanden die kennisoverdracht en kennisbenutting bevorderen. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | De zebravislijnen worden over verschillende generaties gemonitord om te beoordelen of genetische modificaties een effect hebben op het welzijn. Voor de karakterisering en fok met potentieel ongerief zijn maximaal 7500 zebravissen (*Danio rerio*) nodig in de periode van 5 jaar. |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Genetische modificatie van immuungerelateerde genen kan mogelijk leiden tot een grotere vatbaarheid voor infecties. Op grond van eerdere onderzoekservaring verwachten wij dat dit bij slechts enkele nieuw te genereren zebravislijnen zal optreden. Jaarlijks zal de fok met ongerief maximaal 5% van de totale fok van genetische gewijzigde zebravissen in onze faciliteit bedragen. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | De genetisch gemodificeerde vissen worden uitsluitend gebruikt voor de fok (3500 vissen) of direct gedood (2500 vissen) voor karakterisering van het fenotype. Deze vissen ondervinden mogelijk licht ongerief van niet-waarneembare effecten van het verzwakte immuunsyteem en van afname van weefsel (vinknip) voor genotypering of afname van sperma voor invriezing. De fok kan bij sommige dieren tot matig ongerief leiden door het optreden van ziektesymptomen, bijvoorbeeld huidlaesies, openstaande schubben of afwijkend zwemgedrag. Op grond van onze ervaring wordt dit geschat op 30% van de totale fok met ongerief (1500 vissen). Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan één dag voordoen vanwege dagelijkse inspectie en tijdige euthanasie. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Fokdieren worden aanhouden zolang zij gezond en fertiel zijn, tot maximaal 1,5 jaar. Een deel van de fokdieren wordt gedood voor nadere karakterisering van het effect van de genetische modificatie. |

## **4** Drie V's

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | **Vervanging**<br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet | Fok van genetisch gemodificeerde zebravissen is noodzakelijk voor productie van embryo's, die gebruikt worden om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen. Het onderzoek kan niet gerealiseerd worden met celkweek of orgaanculturen, omdat het complexe ziekten betreft en de interactie daarvan met het immuunsysteem. De zebravislijnen met een verzwakt immuunsysteem kunnen in de toekomst mogelijk vervangen worden als er |

| | | |
|---|---|---|
| | gebruikt kunnen worden. | methoden ontwikkeld worden om de benodigde genetische modificaties induceerbaar te maken, zodat geen fok met ongerief meer valt te verwachten. |
| 4.2 | **Vermindering**<br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Fok met ongerief wordt geminimaliseerd, o.a. door aanhouden van heterozygote stocks en invriezen van sperma. Er worden geen zebravislijnen met algehele immuundeficiëntie gekweekt. |
| 4.3 | **Verfijning**<br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | Het gebruik van zebravisembryo's als modelsysteem voor immuniteit biedt een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere gewervelde dieren onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. Ontwikkelingen op gebied van genetische modificatie en zebravisaquariummanagement worden nauwlettend gevolgd om mogelijke verbeterpunten te signaleren. |
| | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | Waterkwaliteit wordt zorgvuldigd bewaakt en gezondheid wordt dagelijks gecontroleerd. Bij ziektesymptomen wordt euthanasie toegepast om ongerief te beperken en besmetting van andere vissen te voorkomen. Stress wordt beperkt door een strikte bedrijfsvoering en beleid met betrekking tot gebruik van oude dieren. |

## **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. | 10612 |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Leiden |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 3.4.4.1<br>Type dierproef: Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

Genetisch gemodificeerde zebravislijnen worden gegenereerd en gefokt om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen infecties. Deze experimenten worden beëindigd voordat de larven het stadium bereiken waarbij zij zich zelfstandig kunnen voeden (5 dagen na bevruchting). De fok van de genetisch gemodificeerde lijnen die voor de productie van embryo's nodig zijn zal in sommige gevallen gepaard kunnen gaan met ongerief, met name vanwege een mogelijke verhoogde vatbaarheid voor ziekten.

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

Om genetisch gemodifeerde zebravislijnen te genereren wordt DNA/RNA en eventueel eiwit geïnjecteerd in 1-cellige zebravisembryo's (zygoten). Om het aantal benodigde dieren te beperken wordt de meest efficiënte methode gebruikt. Bijvoorbeeld, de injectie van RNA voor een CRISPR guide sequentie in combinatie met RNA voor Cas9 of in combinatie met recombinant Cas9-eiwit is op dit moment de meest gebruikte en meest efficiënte methode om een mutatie (deletie of insertie) te genereren. De meest efficiënte methode voor het genereren van een transgene lijn is de injectie van plasmide-DNA dat het transgen bevat, samen met RNA voor Tol2-transposase, dat de integratie in het zebravisgenoom bevordert. De geïnjectereerde embryo's, die mozaïek zijn voor de genetische modificatie, worden opgekweekt tot volwassen dieren (3 maanden). Deze F0-vissen worden uitgekruist tegen wild-type. Overerving van de mutatie wordt bepaald door genotypering van de nakomelingen of door de expressie van een transgen te monitoren (in geval van een fluorescente merker). Genotypering wordt uitgevoerd door genomisch DNA te isoleren uit een stukje van de staartvin dat onder verdoving wordt afgeknipt (vinknip). Dragers van de genetische modificatie worden uitgekruist tegen wild type (of bestaande genetisch gemodificeerde lijnen,

bijvoorbeeld fluorescente reporterlijnen voor immuuncellen) om een F2 te genereren en vervolgens ingekruist om homozygote dieren te verkrijgen. Cryopreservatie van sperma wordt ingezet om backups van de lijnen te maken en om de onderhoudsfok te kunnen beperken.

Nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen, kruisingen van bestaande lijnen of lijnen die door import worden verkregen zullen over twee generaties gemonitord worden om te bepalen of er een verhoogde vatbaarheid voor ziekten of ander teken van ongerief is. In principe valt dit alleen te verwachten bij homozygote kweek van mutanten.

Om te bepalen of een mutant homozygoot gefokt kan worden zullen de embryo's/larven afkomstig van een kruising van heterozygote ouders eerst tijdens de eerste 5 dagen van de ontwikkeling worden gevolgd. Als tijdens deze periode geen verminderde overlevering of ontwikkelingsafwijkingen worden geconstateerd, dan zullen de dieren verder opgekweekt worden tot volwassenheid en zal op een leeftijd van 2-3 maanden een genotypering worden uitgevoerd via vinknippen. Bij afwijking van Mendelische segregatie (minder dan 25% homozygote dieren) is het aannemelijk dat de homozygote mutanten een verminderde levensvatbaarheid hebben en zal de verdere fok van homozygote dieren beschouwd worden als fok met ongerief. Ook als er geen afwijking is van Mendelische segregatie zullen de lijnen nog verder gemonitord worden door dagelijkse controle op symptomen van ziekte. Indien er bij een genetisch gemodificeerde lijnen vaker uitval door ziekte optreedt dan bij de corresponderende wild type lijn zal de verdere fok beschouwd worden als fok met ongerief. Deze families zullen worden gekweekt tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar, aangezien bij oudere vissen de kans op ziekte door infecties toeneemt. Dit is 6 maanden eerder dan de gebruikelijke leeftijd van ongeveer 2 jaar die wij hanteren voor onze reguliere fok, omdat de fertiliteit na deze leeftijd sterk afneemt.

Homozygote fok zal alleen worden uitgevoerd met vissen die geen ernstige afwijkingen vertonen. [redacted]. Deze mutant heeft geen zichtbare afwijkingen, maar gemiddeld worden er vaker zieke vissen bij deze lijn aangetroffen dan bij onze andere lijnen. Bij herkenning van symptomen (zoals afwijkend zwemgedrag, lethargie, vermagering, huidlaesies, openstaande schubben) waarop dagelijkse controle plaatsvindt worden deze vissen onmiddellijk geëuthanaseerd. Vissen die ernstigere afwijkingen vertonen (bijvoorbeeld een structureel abnormaal zwemgedrag) of fertiliteitsproblemen zijn niet bruikbaar voor immunologisch onderzoek en zullen niet homozygoot worden gekweekt.

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

Wij zullen per lijn ongeveer 150 eieren injecteren, hetgeen een gemiddeld aantal van 100 volwassen zebravissen (F0) zal opleveren die mozaïek zijn voor de genetische modificatie. Naar verwachting draagt gemiddeld 20% van de F0-vissen de modificatie over via de kiembaan. De volgende generatie wordt heterozygoot gefokt met wildtype dieren. Deze F1 vissen (ca. 100) worden getest op aanwezigheid van de mutatie en zo geselecteerd voor verdere heterozygote onderhoudsfok. Wij verwachten dat heterozygote dragers van mutaties geen ongerief hebben. Bij transgene modellen verwachten wij ook geen ongerief omdat hierbij induceerbare expressiesystemen en/of onschadelijke fluorescente reporters worden gebruikt. Heterozygote dieren worden minimaal 2 generaties gevolgd (F2 en F3) om er zeker van te zijn dat er geen fenotype/ongerief is. Alleen in het onwaarschijnlijke geval dat heterozygote dieren wel een fenotype blijken te hebben dan zullen deze dieren tellen als dierproef/fok met ongerief. Per generatie worden er gemiddeld 50 vissen gekweekt, wat leidt tot een totaal van 100 heterozygote vissen per lijn voor welzijnsbeoordeling. Voor de kweek van homozygote mutanten wordt eerst in het larvale stadium (5 dagen oude larven) bepaald of er normale Mendelische segregatie is (zie de onderbouwing van de gekozen aanpak hierboven). Indien er in het larvale stadium geen afwijkingen worden geconstateerd, dan worden families van gemiddeld 50 homozygote vissen gemonitord over minimaal 2 generaties, wat leidt tot een totaal van 100 homozygote vissen voor welzijnsbeoordeling. Tot nu toe hebben wij bij slechts 1 mutante lijn ([redacted] van ongeveer 10 lijnen met immuun-gerelateerde mutaties een verhoogde vatbaarheid voor ziekten geconstateerd. Wij verwachten daarom dat er bij niet meer dan 10% van de homozygote mutanten sprake zal zijn van fok met ongerief. In dat geval worden de dieren zoveel mogelijk als heterozygote lijnen aangehouden en alleen in periodes dat er embryo's nodig zijn voor experimenten zullen er kleine families van homozygote vissen worden gekweekt (20-50, afhankelijk van de behoefte). De experimenten met embryo's zijn praktisch niet uitvoerbaar met legsels van heterozygote vissen. Dit zou namelijk leiden tot een verdubbeling van het aantal embryo's dat geanalyseerd moet worden en dat is niet haalbaar vanwege de complexe injectie- en

imagingtechnieken die hierbij gebruikt worden.

**B. De dieren**

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

Zebravis (Danio Rerio), eigen fok

De zebravis als modelsysteem voor immuniteit biedt een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere vertebraten onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. Mutanten in genen van het immuunsysteem worden bijvoorbeeld gekruist met verschillende transgene lijnen waarin de macrofagen en neutrofielen of onderdelen van deze cellen (bijvoorbeeld autofagosomen die een belangrijke rol spelen bij de afweer tegen pathogenen) fluorescent gelabeld zijn. De lijnen worden gegenereerd/gekweekt in ons eigen instituut of verkregen van samenwerkende instituten. De transparante embryonale en larvale stadia van vissen met combinaties van de mutaties en de genoemde fluorescente markers worden vervolgens gebruikt om nieuwe inzichten te krijgen in de functie van genen die betrokken zijn bij signaaltransductieprocessen en mechanismen zoals autofagie die een belangrijke rol spelen bij infectieziekten, kanker en diabetes.

Micro-injectie van RNA/DNA t.b.v. de constructie van nieuwe lijnen wordt uitgevoerd met 1-cellige embryo's. Volwassen vissen worden gekweekt voor het onderhoud van de lijnen en om embryo's te produceren voor gebruik in experimenten, waarbij de leeftijd van maximaal 5 dagen na bevruchting het eindpunt is (i.e. voordat de larven in staat zijn zich zelfstandig te voeden).

Er zijn veel signaalroutes betrokken bij de functie van het immuunsysteem. Kandidaatgenen voor genetische modificatie worden geselecteerd zoals beschreven in het projectvoorstel. Pas indien bij welzijnsmonitoring een fenotype wordt geconstateerd dat gepaard gaat met ongerief, is hier sprake van dierproeven in wettelijke zin. Indien er redenen zijn om aan te nemen dat de genetische modificatie tot een fenotype zou kunnen leiden, dan zal een beperkt aantal dieren worden gedood voor nadere karakterisering van het effect van de mutatie (bijvoorbeeld middels RNA-sequencing en profiling van eiwitten en metabolieten). Deze fenotyperingen verwachten wij per jaar bij maximaal 10 lijnen uit te voeren met gemiddeld 50 vissen per lijn (totaal maximaal 500 per jaar, maximaal 2500 in 5 jaar).

Bij 1 bestaande lijn in onze faciliteit ([redacted]) is er sprake van fok met ongerief. Het ongerief betreft een verhoogde vatbaarheid voor ziekte. Bij slechts een deel van deze vissen (gemiddeld niet meer dan 30%) treden waarneembare ziektesymptomen op. De overige vissen (70%) kunnen mogelijk wel licht ongerief ondervinden van het verzwakte immuunsysteem (subklinische symptomen). Door toepassing van de humane eindpunten zullen de vissen niet langer dan 1 dag waarneembare ziektesymptomen ondervinden. De [redacted] en de nieuw te genereren mutanten worden gefokt in combinatie met verschillende fluorescente reportergenen of andere genetische modificaties. Op grond van onze ervaring (zie toelichting onder A) verwachten wij dat er bij niet meer dan 10% van de nieuwe homozygote mutanten die wij zullen genereren sprake zal zijn van fok met ongerief vergelijkbaar met dat van de myd88-mutant. Deze lijnen zullen niet allemaal tegelijk nodig zijn dus kunnen voor het merendeel van de tijd heterozygoot worden aangehouden. De totale kweek met ongerief (nieuwe genetisch gewizigde dieren [redacted] schatten wij op maximaal 1000 vissen per jaar, i.e. maximaal 5000 vissen over een periode van 5 jaar. Dit betreft circa 5% van de totale jaarlijkse kweek van genetische gewijzigde dieren in onze faciliteit.

In geval dat onder deze vergunning gemaakte zebravissen met potentieel ongerief nodig zijn voor een andere dan aan het immuunsysteem gerelateerde onderzoeksvraag, dan zullen de daarvoor benodigde dieren inclusief de fok met potentieel ongerief worden opgenomen onder een nieuwe aanvraag.

Samengevat:
Max. 2500 zebravissen worden gedood t.b.v. fenotypering
Max. 5000 zebravissen worden gekweekt met ongerief (70% licht, 30% matig) t.b.v productie van embryo's voor experimenten
In totaal: 7500 zebravissen

**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 constructie van genetisch gemodificeerde zebravislijnen en fok met potentieel ongerief is gericht op onderzoeksvragen waarbij de vroege ontwikkelingsstadia van de zebravis (embryo's en niet vrij zwemmende larven) gebruikt kunnen worden, die vanwege hun transparantie bijzonder geschikt zijn voor niet-invasieve microscopische imagingstudies waarbij nieuwe inzichten in de functies van immuuncellen verkregen kunnen worden. Andere proefdieren, zoals de muis, hebben geen externe embryo-ontwikkeling en hierbij zijn dergelijke imagingstudies zonder invasieve technieken niet mogelijk. Bovendien is het in zebravisembryo's/larven mogelijk om de interactie van pathogenen met cellen van het aangeboren immuunsysteem te bestuderen voordat het adaptieve immuunsysteem actief is. Daarmee vormen zebravisembro's/larven een goed model voor het bestuderen van opportunistische infecties die voorkomen bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem. Dit onderzoek is niet mogelijk zonder gebruik van genetisch gemodificeerde proefdieren om embryo's te produceren. Vervanging door cel-of orgaankweken is niet mogelijk, omdat het hier onderzoek betreft naar complexe ziekten en de interactie met het immuunsysteem *in vivo*. Er bestaat met de huidige technologie nog geen alternatief voor de fok met ongerief van genetische modificeerde zebravislijnen met een verzwakt immuunsysteem, maar deze lijnen kunnen in de toekomst mogelijk vervangen worden door conditionele transgen/knockout-lijnen, waarbij geen fok met ongerief valt te verwachten.

Vermindering:
De effectiviteit van iedere CRISPR wordt eerst in embryo's/larven (tot max. 5 dagen na bevruchting) beoordeeld, alvorens wordt besloten of de CRISPR geschikt is om een mutante lijn te genereren. CRISPRs kunnen bovendien direct geïnjecteerd kunnen worden in een gewenste transgene achtergrond (bijvoorbeeld een lijn met fluorescent gelabelde macrofagen en een fluorescente marker voor autofagie), dus kweek benodigd voor het inkruisen van de mutatie in verschillende transgene achtergronden kan hiermee worden beperkt.

Er zullen geen lijnen gekweekt worden met een algehele immuundeficiëntie (zoals bijvoorbeeld bij SCID-muizen). Het onderzoek richt zich op genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunsysteem waarbij slechts een gering effect op de algehele gezondheid te verwachten valt vanwege redundantie in het immuunsysteem en omdat defecten in het volwassen stadium ook gecompenseerd zullen worden door de functie van het adaptieve immuunsysteem dat actief wordt tijdens de eerste 3 weken na bevruchting.

De lijnen zullen als heterozygote stocks aangehouden worden en alleen in periodes dat er veel mutante embryos nodig zijn voor experimenten zullen er kleine families van homozygote vissen worden aangehouden. De fok van weinig gebruikte lijnen zal worden geminimaliseerd.

Verfijning:
Het is aannemelijk dat stressfactoren een negatieve invloed hebben op het immuunssysteem, daarom worden maatregelen genomen om deze zoveel mogelijk te beperken. Het opzetten van kruisingen ten behoeve van de productie van embryo's voor experimenten wordt maximaal 1x per week gedaan.

Naast stress, is veroudering een andere factor die effect kan hebben op het immuunsysteem. De families van vissen die onder fok met ongerief vallen worden gekweekt zullen daarom worden aangehouden tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar, in plaats 2 jaar zoals gebruikelijk is bij wild type lijnen.

Om mogelijke verbeterpunten voor de kweek van zebravissen te signaleren onderhouden de dierverzorgers contacten met andere zebravisfaciliteiten en bezoeken regelmatig workshops over facility management. In de afgelopen jaren hebben wij een nieuw protocol voor het opkweken van larven geïntroduceerd. In plaats

van met droogvoer (fijn stofvoer) worden de larven nu in de eerste 2 weken gevoerd met rotiferen. De larven zijn hierbij na 2 weken zichtbaar groter dan bij het oude protocol en de overlevingspercentages liggen hoger. Iedere mogelijke maatregel die onze standaardkweek nog verder zou kunnen verbeteren zal ook ten goede komen aan de kweek van de mutante lijnen. Onze dierverzorgers hebben recentelijk een training in cryopreservatie gehad zodat wij in de nabije toekomst de onderhoudsfok verder kunnen terugbrengen door van lijnen die tijdelijk niet gebruikt worden sperma in te vriezen.

Wij zullen de ontwikkelingen op het gebied van mutagenese- en transgenesetechnieken nauwlettend volgen (via literatuurstudie, congressen) om de meest efficiënte methoden toe te passen en waar mogelijk verbeterde strategieën voor de productie van conditionele transgenexpressie/mutatie introduceren, waarmee de fok met ongerief mogelijk kan worden teruggebracht.

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.

[redacted] Er wordt gebruik gemaakt van de best mogelijke waterzuiveringsfilters. Het is in een aquarium echter onvermijdelijk dat de vissen in aanraking komen met verschillende microorganismen die in het water leven. Bacteriële filters zijn immers noodzakelijk voor het opruimen van de afvalstoffen van de vissen en dus een belangrijke bepalende factor voor de waterkwaliteit en het algemene welzijn van de vissen. Tussen de bacteriële filters en toestroom van het water naar de aquariumbakken zit een UV-filter waarmee de groei van ongewenste microorganismen in het water zoveel mogelijk wordt beperkt, maar dit geheel voorkomen is onmogelijk. De vissen worden dagelijks op gezondheid gecontroleerd door de dierverzorgers en zij zullen de dieren euthanaseren indien hier aanleiding toe is (zie humane eindpunten). Wij staan in contact met een bedrijf dat specialistische service in pathologisch onderzoek kan bieden, zodat wij in geval van een mogelijke ziekte een snelle route hebben om de vissen te laten onderzoeken en ongewenste besmetting van grotere aantallen dieren te voorkomen.

## 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.

Niet van toepassing

## 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 in 0,004% tricaine bij vinknippen t.b.v genotypering en bij afname van sperma t.b.v. cryopreservatie. Bij symptomen van ziekte worden de humane eindpunten toegepast.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Mogelijke verhoogde vatbaarheid voor ziekten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De zebravissen hebben mogelijk een grotere vatbaarheid voor infecties vanwege een verminderd functioneren van de aangeboren immuunrespons**.**

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

De vissen worden dagelijks gecontroleerd. Humane eindpunten zijn gedefinieerd.

**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.

openstaande schubben, huidlaesies, kromme rug, ernstige vermagering, gezwollen buik, afwijkend zwemgedrag, lethargie, zakken naar de bodem; deze symptomen mogen zich niet langer dan 1 dag voordoen.

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

In de huidige situatie is er 1 mutant die met ongerief wordt gefokt. Bij deze mutant loopt gemiddeld 30% van de vissen de kans om de citeria voor toepassing van een humaan eindpunt te halen. De verwachting is dat fok met ongerief bij minder dan 10% van nieuw te genereren genetische gemodificeerde lijnen (met mutaties in genen betrokken bij de immuunafweer) van toepassing zal zijn en dat bij deze lijnen eveneens 30% van de vissen kans loopt om de criteria te halen. Waarneembare ziektesymptomen zullen zich niet langer dan 1 dag voordoen i.v.m. dagelijkse inspectie.

**K. Classificatie van ongerief**

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

Het vinknippen t.b.v. genotypering en het doden van vissen t.b.v. fenotypering (zonder waarneembare ziektesymptomen) wordt geclassificeerd als mild ongerief. In geval van fok met ongerief verwachten wij (op basis van ervaring [redacted]) dat gemiddeld niet meer dan 30% van de vissen die worden gekweekt tot een leeftijd van maximaal 1,5 jaar waarneembare ziektesymptomen zullen vertonen

(zoals gedefinieerd onder humane eindpunten) of dood worden gevonden terwijl er geen eerdere indicaties voor ziekte waren. Aangezien de dieren dagelijks geinspecteerd worden zullen waarneembare symptomen zich niet langer dan een dag voordoen. Het ongerief wordt daarom geclassificeerd als matig. Voor de overige vissen van dezelfde families (70%), die mogelijk subklinische symptomen dragen, is de classificatie licht ongerief.

Overzicht:

| Beschrijiving negatieve effecten | aantal | classificatie |
|---|---|---|
| wel/geen vinknip & doden t.b.v. fenotypering | 2500 zebravissen | licht |
| wel/geen vinknip, wel/geen sperma-afname & fok met subklinische symptomen | 3500 zebravissen | licht |
| wel/geen vinknip, wel/geen sperma-afname & fok met klinische symptomen | 1500 zebravissen | 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.

De fokdieren worden gebruikt om embryo's te produceren t.b.v. het onderzoek naar het aangeboren immuunsysteem. Deze dieren worden aanhouden zolang zij gezond zijn en fertiel. De fokdieren worden gedood in geval van ziektesymptomen of bij het bereiken van een leeftijd van 1,5 jaar omdat oudere vissen gevoeliger zijn voor infecties en minder fertiel. Indien er redenen zijn om aan te nemen dat een genetische modificatie tot een fenotype zou kunnen leiden, dan zal een beperkt aantal van de fokdieren worden gedood voor nadere karakterisering van het effect van de mutatie.

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.

De dieren worden gedood met een overdosis verdovingsmiddel (i.e. een methode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU) of in een bad van ijswater. Deze laatste methode verdient de voorkeur in geval dat het verdovingsmiddel zou kunnen interfereren met fenotypering (bijvoorbeeld metabole analyses). Voor toepassing van de ijswatermethode zal een ontheffing worden aangevraagd bij de NVWA (zoals al verleend aan andere instituten in Nederland).

☐ Ja

5.

# DEC-advies

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD1060020171767

2. Titel van het project: Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem.

3. Titel van de NTS: De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem.

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: 22-06-2017
   - ✓ aanvraag compleet: 22-06-2017
   - ✓ in vergadering besproken: 06-07-2017
   - ✓ anderszins behandeld: via emailronde
   - ✓ termijnonderbreking(en) van 11-07-2017 t/m 14-07-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ✓ aanpassing aanvraag: 14-07-2017
   - ✓ advies aan CCD: 18-07-2017

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: 11-07-2017
   - Strekking van de gestelde vragen:
     De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de titel, het doel van de aanvraag, vervanging, verfijning, de humane eindpunten en de omvang van de NTS.
   - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlage en 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. Het betreft een project voor de constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief. 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 het maken van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravismodellen om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen. Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan stress- en immuun-gerelateerde ziekten, waaronder infectieziekten, ontstekingsziekten, metabole ziekten en kanker. 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. ). Omdat de genetische componenten van het immuunsysteem tussen zebravis en andere vertebraten in grote mate geconserveerd zijn, biedt het gebruik van de zebravis als modelsysteem voor immuniteit een meerwaarde bij wetenschappelijke vraagstellingen die in andere vertebraten onderzoekstechnisch moeilijk te beantwoorden zijn. Er is de afgelopen jaren veel geïnvesteerd in de ontwikkeling van tal van transgene lijnen waarin de verschillende celtypen van het immuunsysteem of onderdelen daarvan fluorescent gelabeld zijn en transgene lijnen die fluorescente reportergenen bevatten waarmee de activatie van verschillende componenten van de immuunrespons kan worden gevisualiseerd. Met behulp van deze transgene lijnen kan de interactie van immuuncellen met pathogenen of met kankercellen zeer gedetailleerd bestudeerd worden. De zebravisembryo's zijn bovendien erg geschikt voor het ontwikkelen van nieuwe methoden voor drug screening. 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 genereren en fokken van genetisch gemodificeerde zebravislijnen om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren afweer tegen infecties zijn de proefdieren, de onderzoekers, en patiënten met stress- en immuungerelateerde ziektes.
   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 zullen mogelijk ongerief ondervinden als gevolg van het fenotype. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: Het zebravismodel biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van deze ziekten in meerdere stadia van immuniteit, waarbij gebruik gemaakt kan worden van transgene vissen met fluorescent gemarkeerde immuuncellen en van collecties van mutanten voor genetisch onderzoek. Hierdoor zullen de wetenschappers kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.
Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Een beter begrip van de onderliggende mechanismen bij stress- en immuungerelateerde ziektes zal mogelijk leiden tot de identificatie van targets voor nieuwe therapeutische strategieën voor bijvoorbeeld tuberculose, diabetes of kanker.

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. [redacted]. Om up-to-date te blijven en ervaringen uit te wisselen worden regelmatig andere faciliteiten en congressen over de kweek van zebravissen bezocht. Daarnaast is er binnen de zebravisonderzoeksgemeenschap een nauwe samenwerking waardoor men goed op de hoogte is van het onderzoek dat bij andere instituten wordt uitgevoerd en kennisuitwisseling op dit onderzoeksgebied wordt bevorderd. Tevens beschikt men over ruime financiering uit verschillende bronnen.

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 strategie is logisch en helder gekozen en kan 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 afwijkende huisvesting 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. De keuze voor het doden dmv ijswater is naar inziens van de DEC voldoende onderbouwd.

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. [redacted] en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren.

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. Naar inziens van de DEC ondervindt het merendeel van de vissen cumulatief maximaal mild ongerief als gevolg van de vinknip, sperma-afname of subklinische symptomen van het fenotype. Een deel van de vissen zal echter cumulatief maximaal matig ongerief ondervinden als gevolg van klinische symptomen van het fenotype. Deze inschatting is in overeenstemming met het

niveau van het ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. 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. Als modelorganisme biedt de zebravis een aantal specifieke voordelen ten opzichte van bijvoorbeeld de muis. De externe ontwikkeling en optische transparantie van de zebravisembryo's maken dit model bij uitstek geschikt voor niet-invasieve microscopische imagingstudies waarbij nieuwe inzichten in de functies van immuuncellen verkregen kunnen worden. Andere proefdieren, zoals de muis, hebben geen externe embryo-ontwikkeling en hierbij zijn dergelijke imagingstudies zonder invasieve technieken niet mogelijk. de bestudering van vroege ontwikkelingsaspecten van immuniteit. 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. Vervanging door cel-of orgaankweken is niet mogelijk, omdat het hier onderzoek betreft naar complexe ziekten en de interactie met het immuunsysteem *in vivo*.

15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. Voor het genereren van de genetisch gemodificeerde zebravislijnen zal de meest efficiënte methode gebruikt worden. Tevens zal cryopreservatie toegepast worden op lijnen die tijdelijk niet gebruikt worden. 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. Daarnaast zullen er geen lijnen gekweekt worden met een algehele immuundeficiëntie om zo de vatbaarheid voor infecties zo laag mogelijk te houden. 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 zowel mannelijke als vrouwelijke zebravissen gebruiken.

19. De fokdieren worden gebruikt om embryo's te produceren t.b.v. het onderzoek naar het aangeboren immuunsysteem. Deze dieren worden aanhouden zolang zij gezond en fertiel zijn. Een deel van de fokdieren wordt gedood voor nadere karakterisering van het effect van de genetische modificatie. Het doden van de dieren gebeurd

volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Voor het doden dmv de ijswatermethode zal een ontheffing aangevraagd worden zoals eerder verleend is aan andere instituten in Nederland.

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 maken van nieuwe genetisch gemodificeerde zebravismodellen om het aangeboren immuunsysteem te bestuderen, met als uiteindelijke doel het verkrijgen van nieuwe inzichten in de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan stress- en immuun-gerelateerde ziekten, waaronder infectieziekten, ontstekingsziekten, metabole ziekten en kanker het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?

2. Project gericht op het genereren en fokken van genetisch gemodificeerde zebravislijnen om embryo's/larven te produceren waarmee de functie wordt onderzocht van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen infecties.
   Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
   Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: groot voordeel.
   Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: matig voordeel.
   De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de onderzoekers en patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.
   De zebravis is een wetenschappelijk belangrijk modelorganisme voor onderzoek naar humane ziekten omdat het immuunsysteem van de zebravis grote overeenkomsten vertoont met dat van de mens. Bij infectieziekten, ontstekingsziekten, kanker, en diverse andere ziekten speelt het immuunsysteem een grote rol. Het zebravismodel biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van deze ziekten in meerdere stadia van immuniteit, zowel tijdens de ontwikkeling als bij een volledig ontwikkeld immuunsysteem, waarbij gebruik gemaakt kan worden van transgene vissen met fluorescent gemarkeerde immuuncellen en van collecties van mutanten voor genetisch onderzoek. Het genereren en fokken van genetisch gemodificeerde zebravislijnen is van essentieel belang voor de productie van embryo's/larven om de functie van genen die betrokken zijn bij de aangeboren immuunafweer tegen infecties te kunnen onderzoeken. 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 opzet logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie kan 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 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.

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden
[redacted]
Postbus 9502
2300 RA 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
AVD1060020171767

**Bijlagen**
2

Datum 2 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 augustus 2017. Het gaat om uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1060020171767. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

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

**Datum:**
2 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**
2 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

## Gegevens aanvrager

| | |
|---|---|
| Uw gegevens | |
| Deelnemersnummer NVWA: | 10600 |
| Naam instelling of organisatie: | Universiteit Leiden |
| Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: | [redacted] |
| KvK-nummer: | 27 36 89 29 |
| Straat en huisnummer: | Rapenburg 70 |
| Postbus: | 9502 |
| Postcode en plaats: | 2300 RA LEIDEN |
| IBAN: | [redacted] |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer: | Universiteit Leiden /Faculteit W&N |

| | |
|---|---|
| Gegevens verantwoordelijke onderzoeker | |
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | [redacted] |
| Afdeling: | [redacted] |
| Telefoonnummer: | [redacted] |
| E-mailadres: | [redacted] |

**Datum:**
2 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

| | |
|---|---|
| Wat voor aanvraag doet u? | [x] Nieuwe aanvraag<br>[ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn<br>[ ] 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: | Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem |
| Titel niet-technische samenvatting: | De zebravis als model voor onderzoek naar het immuunsysteem |
| Naam DEC: | DEC Leiden |
| Postadres DEC: | Postzone: [redacted] LUMC Postbus 9600 2300 RC Leiden |
| E-mailadres DEC: | [redacted] |

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | Gemandateerd vergunninghouder |
| Plaats: | Leiden |
| Datum: | 25 juli 2017 |

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden
[redacted]
Postbus 9502
2300 RA 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
AVD1060020171767

**Bijlagen**
2

Datum 2 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**
Factuurdatum: 2 augustus 2017
Vervaldatum: 1 september 2017
Factuurnummer: 171767

| **Omschrijving** | **Bedrag** |
|---|---|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1060020171767 | € 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.

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden
[redacted]
Postbus 9502
2300 RA 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
AVD1060020171767

Datum 11 augustus 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 1 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" met aanvraagnummer AVD1060020171767. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

**Niet technische samenvatting**
De opbrengsten beschreven onder 3.2 beschrijven met name de opbrengsten van het uiteindelijke doel. Kunt u deze tekst aanpassen en meer toespitsen op het directe doel van onderliggend project?

**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.

**Datum:**
11 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

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

**Wanneer een beslissing**
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:
- Melding bijlagen

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: Universiteit Leiden

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD1060020171767

**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:**
11 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

## 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

8.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Leiden
[redacted]
Postbus 9502
2300 RA 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
AVD1060020171767
**Bijlagen**
1

Datum 14 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 1 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" met aanvraagnummer AVD1060020171767. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is de NTS aangepast waardoor deze beter aansluit bij het directe doel van het project.

**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 "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Datum:**
14 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

**Procedure**
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Leiden gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 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]

**Datum:**
14 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1060020171767

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: | Universiteit Leiden |
| Adres: | Postbus 9502 |
| Postcode en plaats: | 2300 RA LEIDEN |
| Deelnemersnummer: | 10600 |

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief ten behoeve van onderzoek naar het immuunsysteem" met aanvraagnummer AVD1060020171767, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is hoogleraar immunobiologie. Voor de uitvoering van het project is hoogleraar cellulaire tumorbiologie verantwoordelijk.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 juli 2017, ontvangen op 1 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 augustus 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---|---|---|
| **3.4.4.1 Constructie en fok van genetisch gemodificeerde zebravislijnen met potentieel ongerief** | | | | |
| | Zebravissen (Danio rerio) / | 7.500 | 20% Matig<br>80% 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 wordt, voor 1 april, op basis van de registratie voor de NVWA een rapportage gedaan aan de CCD, 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:**
AVD1060020171767

# 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* 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 | 31 |
| Postbus | | |
| Postcode en plaats | 1105AZ | Amsterdam |
| IBAN | NL68RABO0136166741 | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Factuur sturen aan:<br>AMC crediteurenadministratie<br>Postbus 400<br>1115 ZJ Duivendrecht<br>o.v.v. Kostenplaatsnummer 7525 | |

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 | Principal Investigator |
| Afdeling | Center for Experimental Molecular Medicine |
| Telefoonnummer | [redacted] |
| E-mailadres | |

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

| | |
|---|---|
| (Titel) Naam en voorletters | |
| Functie | Onderzoeker |
| Afdeling | Center for Experimental Molecular Medicine |
| Telefoonnummer | [redacted] |
| 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? | Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Het ontwikkelen van darmkanker preventie strategieën | |
| 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 € 1287,00 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

# 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

# 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

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. | Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden |

## 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.

**Darmkanker**
Darmkanker is een van de meest voorkomende kanker-gerelateerde doodsoorzaken in de westerse wereld. Terwijl de prognose voor patiënten bij *vroege detectie* vrij goed is, met een kans op overleving van 80%, zal slechts 5% van de patiënten met *vergevorderde darmkanker met uitzaaiingen* na 5 jaar nog in leven zijn. Ondanks de recente ontwikkeling van nieuwe therapieën, is resistentie tegen chemotherapie nog steeds een groot probleem bij het behandelen van deze ziekte.

De ontwikkeling van darmkanker verloopt in verschillende fasen, beginnend bij een mutatie in een enkele cel, welke kan uitgroeien tot een (goedaardige) poliep (adenoom), tot een maligne tumor (coloncarcinoom), die eventueel uitzaaiingen (metastasen) veroorzaakt[1].

**Kankerstamcellen in darmkanker**
In de afgelopen jaren zijn er meer en meer aanwijzingen gekomen voor het bestaan van kankerstamcellen in het coloncarcinoom, de medische benaming voor darmkanker. Coloncarcinomen vertonen vaak nog enige gelijkenis met gezond darmweefsel. Zo lijken de glandulaire structuren van gedifferentieerd epitheelweefsel in het coloncarcinoom op de crypten die men in gezond darmepitheel aantreft. Onderin deze crypten, de instulpingen in het darmepitheel, bevinden zich de stamcellen, in het zogenoemde stamcelcompartiment. In een normale darm zijn de stamcellen verantwoordelijk voor de constante vervanging van het darmepitheel, waarbij een deel van de stamcellen na deling differentieert tot gespecialiseerde epitheelcellen. De definitie van een stam cel is dan ook: een ongedifferentieerde cel die gedurende lange tijd zichzelf kan vernieuwen en waarvan de nakomelingen tot verschillende celtypes kunnen differentiëren[2].

Op eenzelfde manier zouden darmkankerstamcellen verantwoordelijk zijn voor tumorgroei, progressie en metastasering van het coloncarcinoom. Het bewijs voor het bestaan van deze kankerstamcellen is voornamelijk afkomstig van tumor-initiatie experimenten. Bij dit type experiment worden verschillende populaties kankercellen uit een tumor geselecteerd op basis van de expressie van bepaalde eiwitmarkers. Deze populaties worden vervolgens getest op de mogelijkheid tot tumor-initiatie door ze subcutaan te injecteren bij immuun-incompetente muizen. Cel-populaties die in staat zijn uit te groeien tot een tumor, met daarin de verschillende celtypes die ook in de oorspronkelijke tumor werden gevonden, inclusief de kankerstamcellen, worden tumor-initiërende cellen genoemd. Deze cellen voldoen aan de klassieke definitie van stamcellen, zelf-vernieuwing en de dochtercellen zijn in staat om tot verschillende celtypes te differentiëren, waardoor deze cel-populatie als de kankerstamcellen worden beschouwd. Gebaseerd op de "kankerstamcel-specifieke" eiwitmarkers die in dit soort experimenten gevonden zijn, wordt bovendien vaak verondersteld dat kankerstamcellen relatief resistent zijn tegen veel gebruikte vormen van therapie. Zo blijven juist de kankerstamcellen in leven na een ogenschijnlijk succesvolle chemotherapie behandeling. Deze cellen kunnen dan vervolgens weer uitgroeien tot een complete tumor.

Tijdens het ontstaan van darmkanker zijn gezonde stamcellen in de crypten in competitie met darmkankerstamcellen wat vaak leidt tot overname van de crypt door de kankercellen. Op dit moment is er nog weinig bekend over het effect van kankermutaties op de stamcelcompetitie in de crypten. In gezonde crypten zijn alle stamcellen in neutrale competitie met elkaar, dit betekent dat de stamcellen elkaar vervangen op een stochastische manier[3]. [redacted][4]. Ongeacht dat deze 'kankerstamcel' een voordeel heeft, betekent dit nog niet dat de hele crypt kwaadaardig wordt. Er bestaat nog steeds een kans dat de gezonde stamcellen deze kwaadaardige stamcel vervangen, waardoor de mutatie uit de crypte verdwijnt. Echter wanneer alle gezonde stamcellen zijn vervangen door 'mutante' stamcellen kan deze crypt nooit meer als gezond worden beschouwd, de crypt noemt men dan 'fixed' of gefixeerd. Daarnaast is de context waarin een mutatie ontstaat van belang, zo geeft een *p53*$^{R172H}$ mutatie in een gezonde darm geen voordeel, maar in een ontstoken (colitis) darm wel. Dat mutante kankerstamcellen door stochastische stamcel-vervanging uit de crypt kunnen verdwijnen voordat een crypt gefixeerd wordt en

hierdoor geen darmkanker kunnen ontwikkelen vormt een interessante mogelijkheid om chemopreventie strategieën op te baseren.

Het is van essentieel belang om de competitieve voordelen van darmkanker-gerelateerde mutaties, waaronder *Apc*, *PTEN*, *Msh2*, *BRAF* en *Pik3ca*, te bestuderen en kwantificeren. Deze mutaties zijn geassocieerd met familiaire en erfelijke darmkankers, en mensen met deze mutaties zullen vrijwel zeker darmkanker ontwikkelen in hun leven. Ons project zal zich daarom volledig focussen op het ontwikkelen van chemopreventieve strategieën voor dit soort mutaties. Naast het kwantificeren van de competitieve voordelen van een darmkanker-gerelateerde mutaties zullen wij testen of er drugs zijn (zoals o.a. aspirine en Tankyrase remmer) die deze voordelen kunnen remmen en hierdoor als chemopreventie kunnen worden gebruikt. De resultaten van deze proeven zijn van essentieel belang voor het ontwikkelen van een chemopreventie strategie voor mensen zodat minder darmcrypten 'gefixeerd' worden met een mutatie en daardoor minder kanker ontstaat. De verkregen resultaten zullen dienen als een proof-of-principlevoor de humane setting, en wij verwachten dan ook dat deze resultaten direct te vertalen zijn naar de humane context. Verder zullen wij de optimale concentratie van de werkende compound bepalen waarmee we de mutante stamcellen kunnen remmen zonder de gezonde stamcellen te beïnvloeden, om op deze manier de kans op het ontstaan van darmkanker te verkleinen. Deze chemotherapeutische strategieën worden vervolgens in een lange termijn proef gevalideerd. Samenvattend: wij willen een serie van experimenten uitvoeren die de kankerstamcel dynamiek kunnen beïnvloeden en hiermee de kans op het ontstaan van darmkanker te verminderen.


1. Fearon, E. F. & Vogelstein, B. for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* **61,** 759–767 (1990).
2. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414,** 105–111 (2001).
3. Snippert, H. J. *et al.* Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell* **143,** 134–144 (2010).
4. [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?

**Algemene doelstelling: het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker.**

- *Hoe beïnvloeden darmkanker-geassocieerde mutaties de stamceldynamiek in de darmen?*
- *Kunnen eerder beschreven chemopreventieve compounds de normale stamcellen beïnvloeden?*
- *Hoe beïnvloeden deze chemopreventieve compounds de mutante kankerstamcellen?*
- *Kunnen wij een optimale dosis van deze compounds bepalen?*
- *Kunnen wij deze compounds gebruiken om de kans op het ontstaan van darmkanker op lange termijn te verkleinen?*

**Haalbaarheid van het project:**

In ons lab hebben we inmiddels meerdere van de benodigde marker-onafhankelijke labeling strategieën ontwikkeld en toegepast op verschillende stamcelmodellen. [redacted]. Het hier beschreven onderzoeksprogramma betreft de kern van de onderzoeksgroep en de proeven beschreven in deze aanvraag zullen uitgevoerd worden door 2 promovendi en 2 postdocs, ondersteunt door 2 analisten. Alle benodigde expertise is binnen onze groep aanwezig zowel voor de in vivo proeven hier beschreven alsook voor de ondersteunende proeven betreffende crypt isolatie en organoïde kweek culturen.

## 3.3 Belang

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

De resultaten van deze proeven zijn van essentieel belang voor het ontwikkelen van een chemopreventie strategie voor mensen. De verkregen resultaten zullen dienen als een proof-of-principle voor de humane setting, en wij verwachten dan ook dat deze resultaten direct te vertalen zijn naar de humane context.

Wetenschappelijk belang: De beschreven proeven zullen aantonen dat wij de stamceldynamiek van de darmen kunnen beïnvloeden waardoor mutaties minder snel gefixeerd worden in de darmcrypten en daarom de kans op het ontstaan van darmkanker verminderd.

Maatschappelijk belang: De laatste jaren is gebleken dat het erg lastig is om darmkanker te bestrijden omdat de darmkanker-geassocieerde mutaties al gefixeerd zijn in het genoom van stamcellen in de darmcrypten. Met de kennis van de hierin beschreven experimenten zal worden voorkomen dat mutaties gefixeerd kunnen worden in de darmcrypten, vóórdat darmkanker überhaupt kan ontwikkelen. Chemopreventie is daarom een optimale manier om het aantal darmkanker patiënten te verminderen en tegelijkertijd ook de gezondheidskosten te drukken. De gevonden resultaten zullen van belang zijn voor de algehele populatie, waar 1 op de 20 mensen darmkanker zal ontwikkelen tijdens zijn/haar leven. Echter, de resultaten zijn het allerbelangrijkst voor mensen binnen de populatie die een verhoogd risico hebben om darmkanker te ontwikkelen, omdat zij al een gemuteerd gen bezitten. De laatste cijfers van de Nederlandse Kankerregistratie laten zien dat in 2015 15.500 nieuwe patiënten met darmkanker zijn gediagnosticeerd, waarvan ongeveer 5% een erfelijke oorzaak heeft. Chemopreventie zou dus jaarlijks veel nieuwe darmkanker patiënten kunnen voorkomen.

## 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Algemene doelstelling: het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker.
Om deze doelstelling te behalen zullen wij voornamelijk gebruik maken van muismodellen.

Met deze muismodellen kunnen wij onderstaande deelvragen beantwoorden:

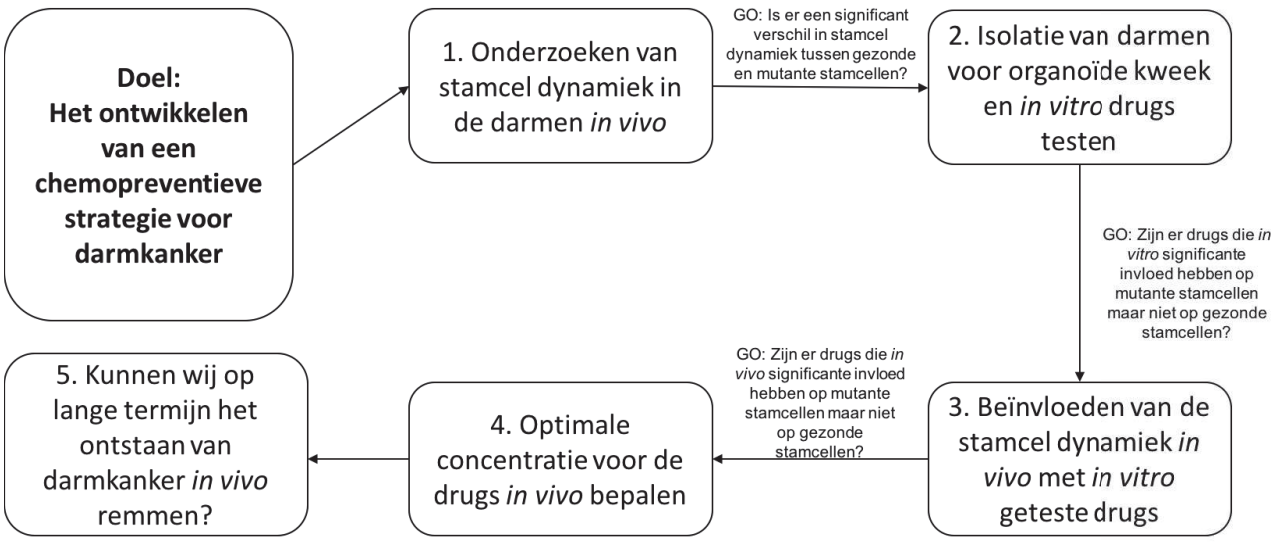
- **Hoe beïnvloeden darmkanker-geassocieerde mutaties de stamceldynamiek in de darmen?**
  Met onze muismodellen kunnen wij stamceldynamiek bestuderen. De muizen worden vervolgens op verschillende tijdspunten geofferd zodat wij de darmen kunnen isoleren en gekleurde stamcellen in de crypten kunnen kwantificeren. Hieruit kunnen wij berekenen hoe lang het duurt voordat crypten worden gefixeerd met een mutatie. Wij zullen deze darmen vervolgens vergelijken met een controle muismodel dat géén mutatie maar wel een kleurenlabel induceert. Aan de hand van deze resultaten kunnen wij vervolgens bepalen of stamcellen met een darmkanker-geassocieerde mutatie een voordeel heeft t.o.v. gezonde stamcellen.

- **Kunnen eerder beschreven chemopreventieve compounds de normale stamcellen beïnvloeden?**
  Er zijn verschillende drugs beschreven die de kans op darmkanker kunnen verminderen in de algehele populatie én voor individuen met een erfelijk kankersyndroom. Met deze deelvraag willen wij beantwoorden wat voor effect deze drugs hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen. Aspirine en AICA Ribonucleotide (AICAR) zijn bijvoorbeeld twee drugs waarvan gedacht wordt dat ze fixatie van respectievelijk *Apc* en *Msh2* in de darmcrypt voorkomen. Wij zullen ook drugs testen die gebaseerd op hun werkingsmechanisme kunnen dienen als positieve controle voor dit experiment. Deze drugs worden verwacht wel invloed te hebben op de stamceldynamiek maar kunnen waarschijnlijk nooit als therapie gebruikt worden doordat ze bekend zijn veel bijwerkingen veroorzaken.

- **Hoe beïnvloeden deze chemopreventieve compounds de mutante kankerstamcellen?**
  Als we de stamceldynamiek na het toedienen van de bovengenoemde compounds bepaald hebben, is het van belang om te onderzoeken of wij de stamceldymamiek van mutante stamcellen kunnen beïnvloeden.

- **Kunnen wij een optimale dosis van deze compounds bepalen?**
  Met deze deelvraag proberen wij de optimale concentratie van een drug te bepalen waarmee we de mutante stamcellen kunnen remmen zonder al te veel bijwerkingen te creëren voor de gezonde stamcellen.

- **Kunnen wij deze compounds gebruiken om de kans op het ontstaan van darmkanker op lange termijn te verkleinen?**
  Met deze deelvraag willen wij alle bovengenoemde doelstellingen valideren: kunnen de geteste drugs op lange termijn het ontstaan van darmkanker tegengaan?




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 uitgangspunt van dit project is het begrijpen van de stamceldynamiek na het verkrijgen van een of meerdere darmkanker-geassocieerde mutaties en het ontwikkelen voor chemopreventieve strategieën om een eventueel competitief voordeel van deze mutante stamcellen tegen te gaan. Muismodellen om de stamceldynamiek te bestuderen en moduleren liggen aan de basis van dit project. Al deze muismodellen

zullen de volgende componenten bevatten:

1. Een darm-specifieke promotor met een induceerbare recombinase (zoals bijvoorbeeld $Cre^{ERT2}$)
2. Een darmkanker-geassocieerde mutatie die met behulp van een induceerbare recombinase tot expressie komt/zijn functie verliest.
3. Een (fluorescent) label waarmee we de geïnduceerde stamcellen kunnen volgen.

**Muismodellen**
Voor het beantwoorden van onze vragen zullen we verschillende zoals hierboven beschreven muismodellen gebruiken. De experimenten zullen 'controle' en 'mutante' muizen bevatten. De controle muizen zullen enkel een kleurlabel induceren in hun stamcellen. De mutante muizen zullen een mutatie induceren in hun stamcellen, het kleurlabel is optioneel en afhankelijk van het muismodel.

**Organoïde culturen**
Om het aantal muizen te verminderen zullen wij van alle muizenmodellen ook de darmen isoleren en organoïde culturen kweken om de drugs eerst op te testen.

**Experimenten set 1. Stamceldynamiek kwantificeren**
Voor alle CRC-geassocieerde mutaties die wij gaan onderzoeken zullen we gebruik maken van een mutant muismodel op basis van figuur 1. Door het eenmalig toedienen van Tamoxifen +/- bNF (afhankelijk van de intestinale promotor) zullen stamcellen in de crypten sporadisch een mutatie en een kleurlabel krijgen. Als deze stamcel zich deelt, zullen alle afstammelingen dezelfde mutatie en kleurlabel ontvangen. Door vervolgens op verschillende tijdspunten de muizen te offeren, de darmen te isoleren, en de labels in de darmen te kwantificeren, kunnen wij de stamceldynamiek modelleren. Als controle zullen wij een muismodel gebruiken met een intestinale promotor en een label, maar zonder induceerbare mutatie. Met dit controlemodel kunnen wij de stamceldynamiek van gezonde darmcrypten modelleren.

**Experimenten set 2. Drug screen op organoïde culturen**
Om uiteindelijk een chemopreventieve strategie te ontwikkelen is het van groot belang om een breed spectrum aan remmers te testen. Deze remmers kunnen worden onderverdeeld in drie hoofdgroepen (1) anti-inflammatoire drugs (2) anti-morfogene drugs (3) anti-proliferatieve drugs. Daarnaast zullen wij ook drugs testen waarvan eerder is beschreven dat zij wellicht een effect kunnen hebben op de stamceldynamiek. Om het aantal muizen die we nodig hebben om al deze drugs te testen drastisch te beperken kunnen wij deze drug screen *in vitro* uitvoeren. Dit betekent dat wij de darmen van de mutante muismodellen zullen isoleren en hier organoïde culturen van groeien. De organoïde culturen hebben een zelfde structuur en functie als *in vivo* en zijn hierdoor een perfect model om de screen uit te voeren. Wij zullen de drugs daarom uittesten op organoïde culturen en zullen het effect van de drugs bekijken aan de hand van (1) groeisnelheid, (2) clonogeniteit, (3) en celdood. De compounds met de meest significante effecten zullen vervolgens *in vivo* getest worden.

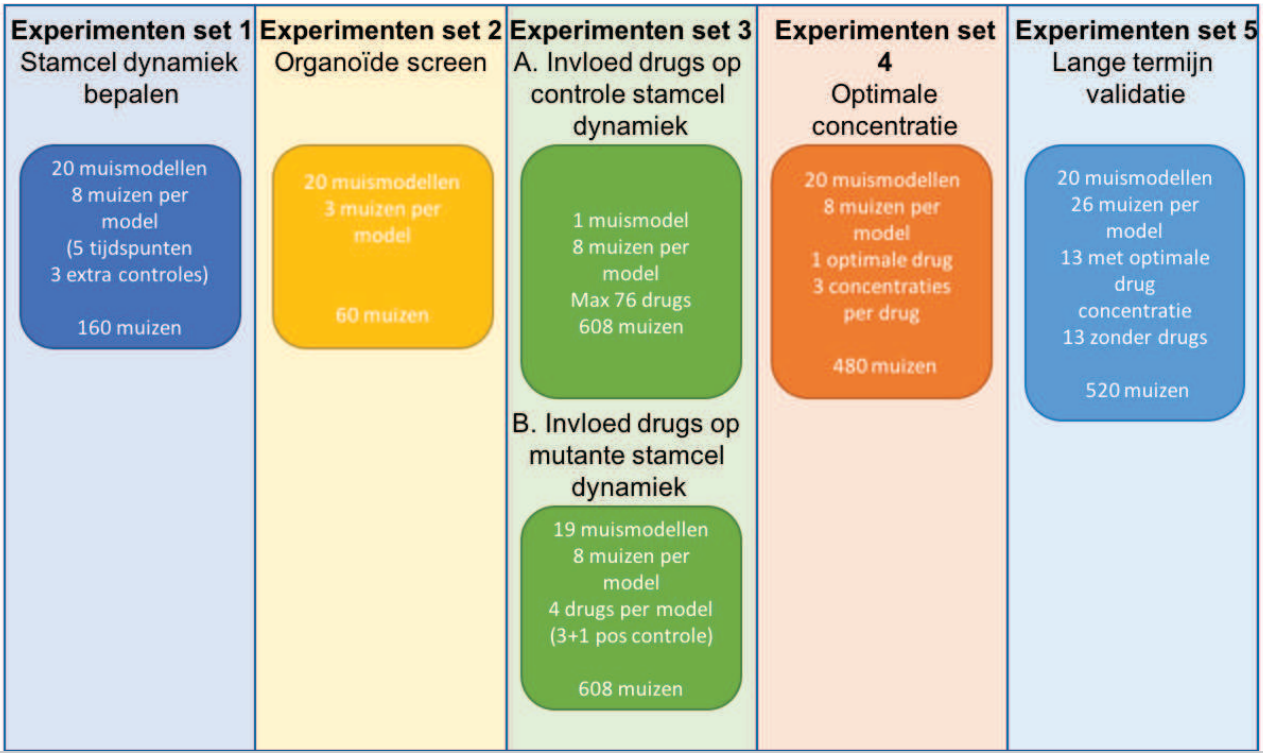
**Experimenten set 3. In vivo drug screen**
Tijdens een *in vitro* organoïde screen hebben wij drugs gevonden die een effect kunnen hebben op de stamceldynamiek in de aan/afwezigheid van verschillende darmkanker geassocieerde mutaties. Deze drugs zullen wij vervolgens gaan testen in onze muismodellen. Ten eerste zullen wij testen of deze drugs invloed hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen m.b.v. ons controle muismodel. Een week voordat de mutatie+kleurlabel wordt geïnduceerd zullen wij beginnen met het toedienen van de drugs zodat het darmepitheel al in contact is met de drug. De drug zal worden toegediend tot de muizen worden geofferd. Ter controle zullen wij ook drugs testen met soortgelijke werkingsmechanismen als de initiële drugs waarvan we weten dat ze niet als chemopreventieve drugs gebruikt kunnen worden door hun grote hoeveelheid bijwerkingen. De drugs die geen significant effect hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen zullen vervolgens worden getest in onze mutante muismodellen.

**Experimenten set 4. Optimale dosis bepalen**
Tijdens onze drug screen zullen wij een aantal compounds vinden die de stamceldynamiek van mutante stamcellen zal remmen, zonder een significant effect te hebben op de gezonde darmstamcellen. Van deze

drugs zullen wij vervolgens de optimale dosis gaan bepalen. We willen de dosis vinden waarbij de mutante stamcellen maximaal worden geremd zonder bijwerkingen te veroorzaken in de gezonde stamcellen. De proefopzet zal hetzelfde zijn als de hiervoor beschreven proeven. In het kort: drugs zullen in verschillende doses worden toegediend aan de muizen één week voordat we de mutatie/controlelabel induceren. Drugs zullen in verschillende concentraties blijvend worden toegediend totdat de muizen worden geofferd. De darmen zullen worden geïsoleerd en de stamceldynamiek zal worden gekwantificeerd.

**Experimenten set 5. Validatie van de chemopreventieve effecten**
Wij hebben nu compounds gevonden die op korte termijn de stamceldynamiek van mutante stamcellen kunnen beïnvloeden. Vervolgens gaan we de chemopreventie effecten van deze compounds valideren om te kijken of er op lange termijn minder tumoren zullen vormen in de darmen van deze muizen. Doordat de dieren tijdens deze experimenten langer in de proef zullen blijven, is de kans groter (dan voorgaand beschreven kortere experimenten) dat deze dieren darmtumoren zullen ontwikkelen.

Het verwachte aantal muizen per experimenten set is hieronder weergegeven:




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.

Alle experimenten moeten leiden tot een beter begrip van het ontstaan van darmkanker, de invloed van darmkanker-gerelateerde mutaties, en hoe wij deze effecten kunnen remmen om zo darmkanker te voorkomen. Om zo dicht mogelijk bij de natuurlijke condities te blijven, hebben wij gekozen om enkel muismodellen te gebruiken. Muismodellen worden al jaren gebruikt om de ontwikkeling darmkanker te modelleren en kunnen vaak direct vertaald worden naar de humane setting. Daarnaast hebben wij gekozen om van deze muismodellen organoïde culturen te kweken. Doordat deze organoïde culturen hun originele 3D structuur en functie behouden kunnen wij *in vitro* een grote drug screen starten. Hierdoor zullen wij sneller weten welke drugs we *in vivo* moeten gaan testen en zal het aantal gebruikte muizen aanzienlijk verminderen. Ten slotte zullen wij compounds hebben getest die voldoen aan de volgende eisen:

- Géén effect op gezonde stamceldynamiek *in vitro*. Dit kunnen wij bepalen door groeisnelheid/celdood/clonogeniciteit van de gezonde organoids te kwantificeren en te vergelijken met de onbehandelde controle organoids. Tussen deze twee groepen mag géén significant verschil in groeisnelheid/celdood/clonogeniciteit worden gevonden (d.m.v. tweezijdige t-test).
- Wél effect op mutante stamceldynamiek *in vitro*. Dit kunnen wij bepalen door groeisnelheid/celdood/clonogeniciteit van de mutante organoids te kwantificeren en te vergelijken met de onbehandelde mutante organoids. Tussen deze twee groepen moet een significant verschil in groeisnelheid/celdood/clonogeniciteit worden gevonden (d.m.v. tweezijdige t-test. $P<0.05$).
- Géén effect op gezonde stamceldynamiek *in vivo*. Dit kunnen wij visueel beoordelen aan de hand van de darmstructuur na isolatie van de darmen. Is de normale structuur van de darm behouden? D.w.z. zien wij een duidelijk gedefinieerde crypt/villus [redacted] In principe kijk je hoe snel een stamcel met fluorescent label een hele darmcrypt kan overnemen. Tussen controle en behandelde gezonde stamcellen mag géén significant verschil in snelheid van crypt overname gevonden worden (d.m.v. tweezijdige t-test. $P<0.05$).
- Wel effect op mutante stamceldynamiek *in vivo*. Echter, pas als er géén negatief effect van de compounds wordt gevonden op de gezonde darmen *in vivo* zullen wij gaan testen of deze compounds wél effect hebben op de mutante darmen *in vivo*. Net als voor de gezonde stamcellen zullen wij ook de stamceldynamiek in mutante stamcellen kwantificeren. In dit geval moeten wij een significante afname in snelheid van crypt overname detecteren in de behandelde mutante stamcellen (d.m.v. tweezijdige t-test. $P<0.05$).
- Optimale dosis *in vivo* bepaald met maximale remming mutante stamceldynamiek zonder/minimale bijwerkingen in gezonde darmcellen. Hier zullen wij een aantal concentraties van de drugs testen waarbij de optimale concentratie de mutante stamcellen maximaal remt (hoogste afname en hoogste significante) terwijl de gezonde stamcellen niet worden aangedaan (geen significante afname in crypt overname)

De drugs die aan al deze voorwaarden voldoen zullen worden gevalideerd in een lange termijn proef. We zullen deze drugs in hun optimale concentratie een week voor de inductie van de mutatie/controle toedienen tot we ze offeren tussen de 6-9 maanden, tenzij de muizen hun humane eindpunt eerder hebben bereikt. Op het punt dat we de muizen offeren zullen we de darmen isoleren en het aantal ontstane tumoren bepalen.

Mijlpalen:
- **Experimenten set 1**: Wij zullen voor het eerst de invloed van darmkanker-geassocieerde mutaties op stamceldynamiek kwantificeren. Na onze eerste experimenten set kunnen wij zien of een darmkanker-geassocieerde mutatie wel of geen effect heeft op de stamceldynamiek. Bij geen effect zullen wij experimenten m.b.t. deze mutatie niet voortzetten.
- **Na Experimenten set 5**: De drugs waarvan wij zien dat zij een remmend effect hebben op het ontstaan van darmkanker op lange termijn kunnen verder onderzocht worden en uiteindelijk eventueel in de kliniek worden getest. Om in de kliniek gebruikt te kunnen worden zullen wij voornamelijk drugs testen die al wettelijk zijn goedgekeurd en misschien ook al gebruikt worden (zoals aspirine bijvoorbeeld).

Keuzemomenten:
- **Experimenten set 1**: Als stamcellen met mutaties géén voordeel hebben t.o.v. de gezonde stamcellen zullen wij deze specifieke mutatie niet verder kunnen testen voor experimenten set 2-5.
- **Experimenten set 2**: Als drugs die wij *in vitro* op de organoïde culturen testen niet blijken te werken, zullen wij deze niet testen in onze *in vivo* experimenten set 3. Niet werken houdt in: (1) drug heeft effect op gezonde stamcellen en/of (2) drug heeft geen effect op mutante stamcellen.
- **Experimenten set 3**: Als drugs in de *in vivo* drug screen een negatief effect hebben op de stamceldynamiek van gezonde darmen, zullen wij deze niet verder testen in de mutante darmen.

Als de drugs *in vivo* vervolgens geen of een versnellend effect hebben op de stamceldynamiek van mutante darmen zullen wij niet verder gaan met de experimenten beschreven in experimenten set 4 en 5.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|---|---|
| 1 | Isolatie darmen voor organoïde kweek |
| 2 | Muismodelmodel voor darmkanker initiatie |
| 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 | Strategieën tegen darmkanker |
| 1.2 | Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | Darmkanker, stamcellen, mutaties, chemopreventie |

## 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)

Darmkanker is de vorm van kanker waaraan de meeste mensen overlijden. In de afgelopen jaren is het duidelijker geworden dat veranderingen (mutaties) in bijzondere cellen in de darm (de stamcellen) de oorzaak zijn voor het ontstaan en uitzaaiien van darmkanker.
In gezonde darmen zijn de stamcellen verantwoordelijk voor het vervangen van oude “versleten” cellen door nieuwe. We weten nu dat stamcellen die gemuteerd zijn, de gezonde stamcellen langzaam vervangen. We noemen dit de kankerstamcellen.
In dit project onderzoeken we waarom deze “kankerstamcellen” succesvoller zijn dan gezonde stamcellen. Het doel is de succesfactor weg te nemen. Op deze manier hopen we te voorkomen dat kankerstamcellen de gezonde stamcellen vervangen en het ontstaan van darmkanker te vertragen. Dit is belangrijk voor mensen die erfelijke of familiare mutaties hebben en daarom een verhoogde kans hebben op darmkanker.

| | | |
|---|---|---|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Dit onderzoek moet duidelijke maken wat de invloed is van mutaties op het gedrag van stamcellen en hoe deze gemuteerde (kanker)stamcellen kunnen worden geremd. Het is van groot belang om te voorkomen dat alle stamcellen worden vervangen door mutante stamcellen. Als wij medicijnen vinden die de voordelen van de mutante stamcellen ten opzichte van de gezonde stamcellen wegnemen, dan zal de kans op het daadwerkelijk ontstaan van darmkanker afnemen. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Wij hebben de komende vijf jaar maximaal 2436 muizen nodig |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Wij testen voor dit project medicijnen op muizen om te kijken of ze de gemuteerde kankerstamcellen de pas kunnen afsnijden. De muizen die worden behandeld, ervaren hiervan mogelijk bijwerkingen.<br>Op lange termijn kunnen muizen tumoren ontwikkelen in hun darm en hiervan mogelijk negatieve gevolgen ervaren. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | 9 procent van alle muizen zal licht ongerief ervaren.<br>91 procent van alle muizen zal matig ongerief ervaren door bijwerkingen van de gebruikte medicijnen en tumorgroei in de darm |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Om de darmen te kunnen analyseren, worden de dieren aan het eind van het experiment gedood. |

## **4** Drie V's

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | **Vervanging**<br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Voor dit experiment gebruiken we muizen die gevoelig zijn voor het ontwikkelen van darmkanker. Dit is de meest accurate nabootsing van de menselijke situatie en dit is op dit moment onvervangbaar. |
| 4.2 | **Vermindering**<br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | Door statistische methoden te gebruiken kan het aantal dieren tot een minimum beperkt blijven. Verder gebruiken wij één muis per tijdspunt, omdat we per muis honderden stamcellen tegelijk kunnen volgen en elke stamcel individueel kunnen bestuderen. Tevens zullen wij het aantal muizen dat wij gebruiken aanzienlijk verminderen door de drugs eerst te testen in het laboratorium. Op deze manier kunnen we een heleboel medicijnen uitsluiten die hoogstwaarschijnlijk in levende proefdieren ook niet werken. |
| 4.3 | **Verfijning**<br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de | We gebruiken voor deze dierproeven uitvoerig geteste genetisch gemodificeerde muizen. Deze hebben de laatste jaren bewezen een nauwkeurige maatstaf te zijn om de dynamiek van stamcellen in de darmen te bestuderen. |

| | |
|---|---|
| doelstellingen van het project. | |
| Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | De muizen worden gedurende het experiment regelmatig gemonitord op uiterlijk, houding, gedrag en activiteit. Het duidelijk vaststellen en bewaken van humane eindpunten zorgt ervoor dat ernstig ongerief zal worden voorkomen. |

## **5** In te vullen door de CCD

| | |
|---|---|
| Publicatie datum | |
| Beoordeling achteraf | |
| Andere opmerkingen | |

4.

# 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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 1 — Type dierproef: Isolatie darmen voor organoïde kweek |

## **2** Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

Voor het bestuderen van effecten van drugs op stamceldynamiek hebben wij gekozen voor het gebruik van organoïde kweek afkomstig uit de darmen van onze gemodificeerde muismodellen om *in vitro* een drug screen uit te voeren. Deze kweken zullen precies dezelfde celtypen en functies hebben als de darm *in vivo* zou hebben. Door een drug screen eerst in vitro te testen kunnen wij al enigszins voorspellen welke drugs er in vivo ook daadwerkelijk effect zullen hebben. Hierbij reduceren wij het aantal te gebruiken muizen enorm. De uitkomstparameter van deze dierproef is dan ook een permanente organoïde kweek als resultaat van de darmisolatie.

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 onder juiste anesthesie geofferd worden en de darmen worden in het geheel geïsoleerd. Vervolgens zullen de crypten uit de darmen worden gehaald en *in vitro* als organoïde culturen worden gegroeid.

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

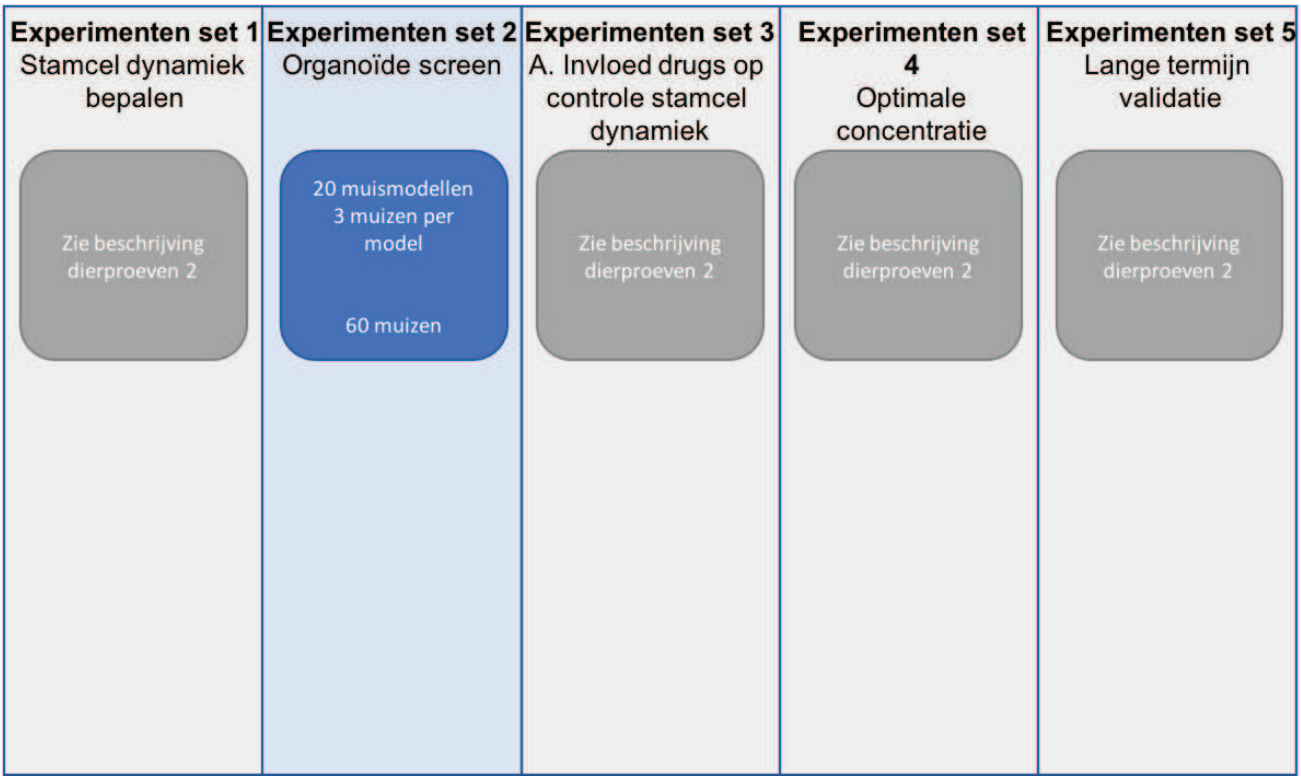
In principe kunnen wij uit één muizendarm per muismodel een organoïde cultuur starten. Echter, omdat er tijdens de procedure infecties kunnen ontstaan die het maken van de kweek belemmeren vragen wij twee extra muizen per muismodel aan die enkel gebruikt zullen worden wanneer het bij de eerste (of tweede) muis niet is gelukt. Als er eenmaal een organoide cultuur van een muismodel is opgezet, kunnen deze culturen worden geëxpandeerd en in principe *voor altijd* in kweek worden gehouden, ingevroren worden, en

eventueel ook op een later tijdstip opnieuw worden gebruikt. Dit wil zeggen: Als wij eenmaal de organoide cultuur hebben opgezet kan deze cultuur voor alle beschreven in vitro experimenten gebruikt worden.

**B. De dieren**

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

| | |
|---|---|
| Diersoort | Muis |
| Herkomst | Eigen fok |
| Geschatte aantal verschillende modellen | 20 |
| Geschatte aantal muizen per model | 3 |
| Geschatte aantal **totale muizen** | 60 |
| Levensstadium | 6-12 weken bij start experiment |
| Geslacht | m/v |




De genotypes van de eerste muismodellen zijn al bekend en bevatten de volgende mutaties:

1. Controle muismodel → Intestinale promotor + fluorescent label
2. Apc $^{-/fl}$
3. Apc $^{fl/fl}$
4. Msh2 $^{-/fl}$
5. Msh2 $^{fl/fl}$
6. LSL-Kras$^{G12D}$
7. LSL-Pik3ca
8. PTEN $^{fl/fl}$

Deze muismodellen zijn al gemaakt, of worden op dit moment gegenereerd. Andere muismodellen die onder dit project zullen vallen hebben (1) mutaties die geassocieerd worden met genetische aanleg voor het ontwikkelen van darmkanker (2) mutaties die veel voorkomen tijdens de ontwikkeling van darmkanker, of (3) een combinatie van darmkanker geassocieerde mutaties en zullen later kenbaar gemaakt worden.

**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*: Een organoid is een kleine versie van het echte orgaan, maar heeft wel alles wat de grote versie ook heeft. De normale darmwand is niet opgebouwd uit één type cel, maar dat meerdere typen cellen samenwerken om de darmfunctie goed uit te voeren. Vergeleken met het gebruik van dierproefvrije alternatieven, zoals cellijnen afkomstig van één celtype, is het met organoids mogelijk om een compleet beeld van darmproblemen te krijgen. Veel ziektes zijn namelijk niet het probleem van een enkele cel die iets fout doet, maar van een verkeerde samenwerking tussen cellen. Door te kijken naar een 3D-variant waarin alle cellen zich net zo gedragen als in een echte darm, lijkt het al veel meer op de werkelijkheid.

*Vermindering:* Het gebruik van een organoïde cultuur leidt deels tot een vermindering van het gebruik van onze muismodellen. Wij willen graag zo veel mogelijk drugs testen om uiteindelijk een goede compound te vinden die stamceldynamiek van mutante stamcellen remt, maar de gezonde stamcellen niet negatief beïnvloed. Door al deze compounds eerst *in vitro* te testen op een organoide kweek kunnen we alvast veel drugs uitsluiten waarvan we voorspellen dat ze geen effect lijken te hebben op de stamceldynamiek. Hierdoor hoeven wij *in vivo* minder drugs te testen, waardoor wij uiteindelijk veel minder muizen nodig hebben.

*Verfijning:* Om de kans op ongerief voor de muis tot een minimum te beperken zullen we de muizen onder anesthesie brengen alvorens ze geofferd worden. Deze handelingen worden alleen uitgevoerd door ervaren medewerkers. Tevens zullen ook alleen medewerkers met veel ervaring op het gebied van organoïde kweken maken de daadwerkelijke kweken ook opstarten, zodat de kans op het gebruik van meerdere muizen verkleind wordt.

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

De dieren zullen onder anesthesie (volgens de juiste richtlijnen) geëuthanaseerd worden.
De kans op nadelige milieueffecten zullen wij vermijden door volgens de DM-I (en indien nodig DM-II) regelgeving voor dierproeven te werken in het AMC. Om verdere risico's te beperken zullen slechts de geïsoleerde weefsels naar het laboratorium worden meegenomen, in dubbel afgesloten containers en worden geanalyseerd in ML-II laboratoria.

## 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.

N.V.T.

## 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?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

**J. Humane eindpunten**

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

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

**K. Classificatie van ongerief**

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

Doden onder anesthesie: licht ongerief.
Cumulatief: licht 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.

Wij zullen de muis moeten doden om zijn darmen te kunnen isoleren.

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.

# 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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 2<br>Type dierproef: Muismodel voor darmkanker initiatie |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

Wij hebben gekozen voor het gebruik van muismodellen om de stamceldynamiek van gezonde en mutante stamcellen in de darm te bestuderen. De primaire keuze is gebaseerd op het feit dat wij de normale homeostase van de darm willen bestuderen over tijd, iets wat het makkelijkst kan worden gedaan met een muismodel. De muismodellen die wij ontwikkeld hebben en nog zullen ontwikkelen bevatten de volgende componenten:

1. Een darm-specifieke promotor met een induceerbare recombinase (zoals bijvoorbeeld $Cre^{ERT2}$)
2. Een darmkanker-geassocieerde mutatie die met behulp van een induceerbare recombinase tot expressie komt/zijn functie verliest.
3. Een (fluorescent) label waarmee we de geïnduceerde stamcellen kunnen volgen.

Het experiment zal worden gestart als een eenmalige tamoxifen (en bNF) injectie i.p. wordt toegediend. Door eerdere experimenten weten wij wat de optimale tamoxifen dosis is om ongeveer 1-5% van de stamcellen in de darm van een mutatie + kleurenlabel te voorzien. Als controle zullen wij een muismodel gebruiken waarbij na toediening van tamoxifen enkel een kleurlabel wordt gegeven aan de stamcellen. Vervolgens kunnen wij over tijd kwantificeren hoe snel deze mutante stamcel de andere gezonde stamcellen in de darmcrypt overneemt. Dit vergelijken wij met de 'normale' snelheid waarmee een normale stamcel andere stamcellen kan vervangen. De snelheid waarmee een darmcrypt volledig gevuld is met een kleurlabel is dan onze primaire uitkomstparameter

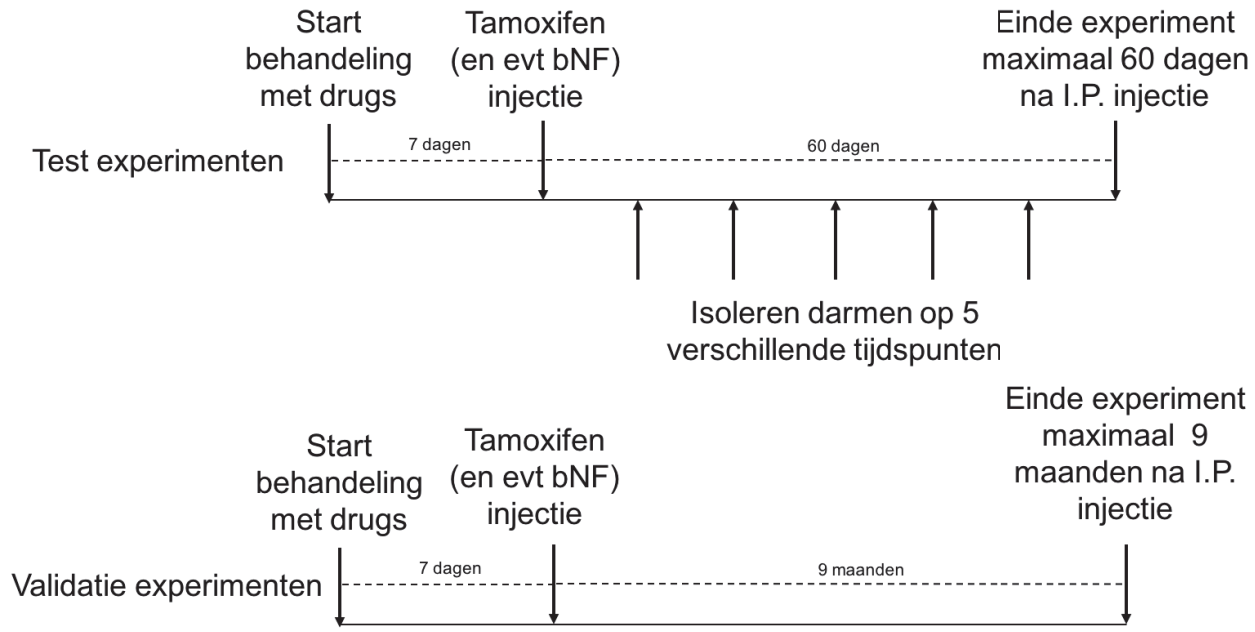
Aangezien de darmen van een muis honderdduizenden darmcrypten bevat, kunnen wij in duizenden crypten tegen gelijk onze primaire uitkomstparameter kwantificeren. In principe zullen dus na toevoeging van tamoxifen duizenden mini-experimentjes starten waardoor wij maar 1 muis per tijdspunt hoeven te

gebruiken.
Nog een voordeel van het gebruik van een muismodel is dat het vrijwel direct kan worden vertaald naar de humane setting. Dit komt omdat de stamceldynamiek in de muiz vergelijkbaar is met die van een mens.

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

Alle experimenten zullen de volgende handelingen bevatten (zie ook **figuur 1**):

- De muizen zullen eenmalig een i.p. injectie krijgen van 0.15mg tamoxifen(+ 40mg/kg bNF), afhankelijk van de promotor) in 50-100uL zonnebloemolie om het systeem aan te zetten.
- De muizen zullen op 5 verschillende tijdspunten geofferd worden. Vervolgens zullen de darmen van de muizen geïsoleerd worden voor verder onderzoek.
- Als de muizen drugs toegediend krijgen, zal de behandeling gestart worden binnen 1 week vóór de i.p. tamoxifen injectie, en vervolgd worden totdat de muis geofferd wordt. De dosering van de behandeling zal bepaald worden aan de hand van de meest recente literatuurgegevens en pilotexperimenten. De drugs zullen worden toegediend via de volgens literatuur beschreven juiste toedieningsweg die nooit meer dan licht ongerief zal geven. Per muismodel verwachten wij uiteindelijk 3 drugs te testen.
- De kortdurende experimenten zullen maximaal 60 dagen duren na toediening van tamoxifen
- De langdurende validatie experimenten zullen maximaal 9 maanden duren na toediening van tamoxifen. Tijdens deze experimenten kunnen de dieren darmtumoren ontwikkelen.




**Figuur 1.** Opzet van de experimenten.

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

Zoals hierboven beschreven zullen wij voor onze kortdurende experimenten (het kwantificeren van stamceldynamiek en het beïnvloeden van de stamceldynamiek) maar één muis per tijdspunt nodig hebben, aangezien we duizenden darmcrypten per muis individueel kunnen bestuderen. [redacted] Om het aantal stamcellen per crypt (*N*), de snelheid waarmee deze stamcellen elkaar vervangen (*lambda*), en de 'replacement bias' ($P_R$) te bepalen, hebben wij minimaal 5 tijdspunten nodig. Ook hebben wij getest of 3-4 tijdspunten genoeg kan zijn voor onze analyse maar met een CI van 95% konden wij geen accuraat resultaat behalen. Vijf tijdspunten is dus het minimaal aantal tijdspunten dat wij nodig hebben voor een accurate analyse.
Wij zullen naast deze 5 tijdspunten nog 1 tijdspunt toevoegen aan het eind van het experiment (maximaal 60 dagen na toediening van tamoxifen) om de drift parameters te kunnen valideren door een schatting te maken van het aantal gefixeerde crypten op dat tijdspunt met behulp van de eerdere tijdspunten. Om te

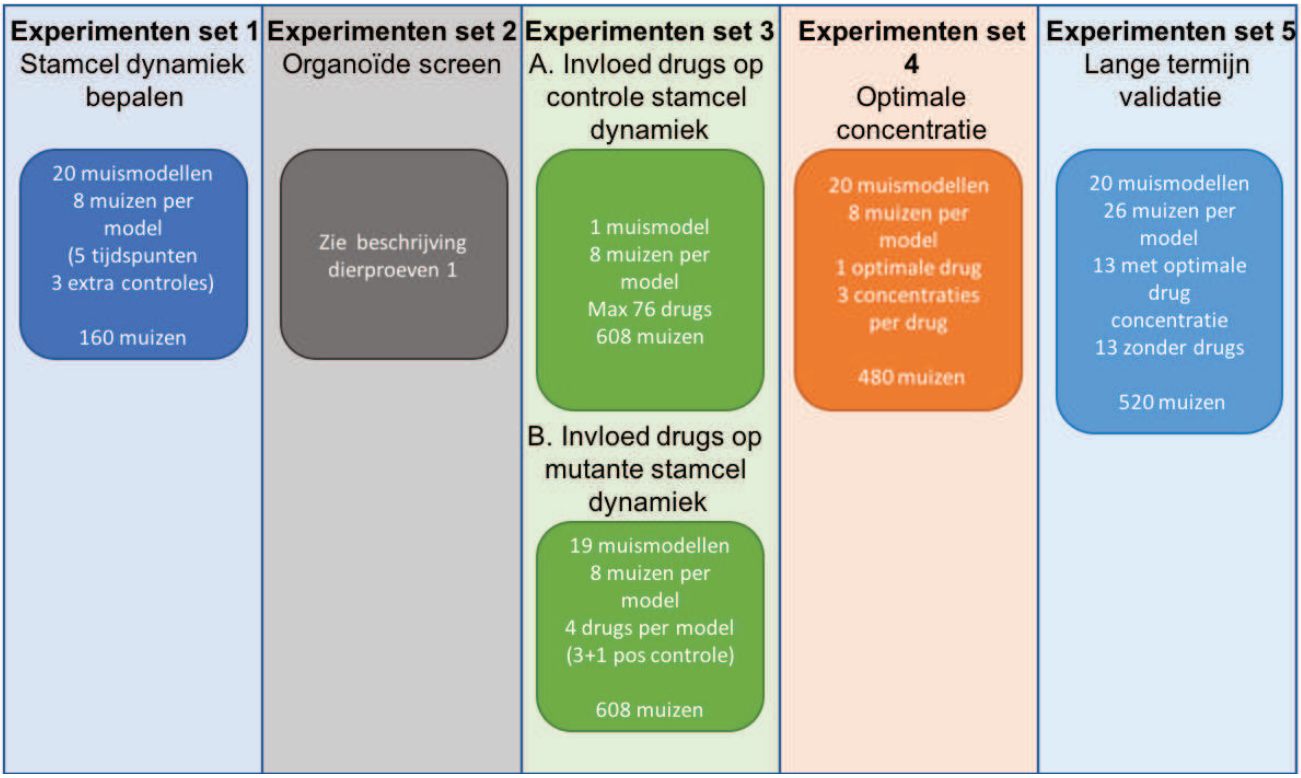
controleren of de i.p. injectie in alle muizen hetzelfde effect heeft (inter dier variatie) zullen wij per conditie nog twee extra muizen toevoegen die wij op één van de vijf tijdspunten zullen offeren. Dit aantal is genoeg gebleken uit onze eerdere experimenten [redacted]), we hoeven op deze manier geen twee muizen per tijdspunt te gebruiken om de inter dier variatie te onderzoeken.

Voor de langer durende validatie experimenten willen wij het verschil in aantal tumoren na 6-9 maanden per muismodel kwantificeren. Aan de hand van de literatuur hebben wij een powercalculatie gedaan om het aantal muizen per groep te bepalen. Om 30% verschil in tumor aantallen waar te nemen met een power van 0.8 en een p-waarde van 0.05 hebben wij 13 muizen per conditie per muismodel nodig.

**B. De dieren**

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

| | |
|---|---|
| Diersoort | Muis |
| Herkomst | Eigen fok |
| Geschatte aantal verschillende modellen | 20 |
| Geschatte aantal muizen per model | 125 |
| Geschatte aantal **totale muizen** | 2376 (**figuur 2** |
| Levensstadium | 6-12 weken bij start experiment |
| Geslacht | m/v |




De genotypes van de eerste muismodellen zijn al bekend en bevatten de volgende mutaties:

1. Controle muismodel → Intestinale promotor + fluorescent label
2. Apc $^{-/fl}$
3. Apc $^{fl/fl}$
4. Msh2 $^{-/fl}$
5. Msh2 $^{fl/fl}$
6. LSL-Kras$^{G12D}$
7. LSL-Pik3ca
8. PTEN $^{fl/fl}$

Deze muismodellen zijn al gemaakt, of worden op dit moment gegenereerd. Andere muismodellen die onder dit project zullen vallen hebben (1) mutaties die geassocieerd worden met genetische aanleg voor het

ontwikkelen van darmkanker (2) mutaties die veel voorkomen tijdens de ontwikkeling van darmkanker, of (3) een combinatie van darmkanker geassocieerde mutaties en zullen later kenbaar gemaakt worden.

**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*: Het gebruik van een muismodel voor de initiatie van darmkanker is de meest accurate nabootsing van de complexe menselijke situatie en is daarom op dit moment onvervangbaar. Wél kunnen wij drugs eerst testen op *in vitro* gekweekte organoïde culturen afkomstig van de darmen van de desbetreffende muizen. Alhoewel wij niet alle muizen kunnen vervangen voor organoide kweken kunnen wij hiermee wel zeker het aantal gebruikte muizen verminderen (zie volgende sectie)

*Vermindering:* Door goed onderbouwde statistische methoden te gebruiken voorafgaand aan de uitvoering van de experimenten, zal het aantal dieren tot een minimum beperkt blijven. Daarnaast zorgt constante evaluatie van de voorgaande experimenten dat er alleen zinvolle vervolg experimenten uitgevoerd zullen worden. Verder gebruiken wij in principe maar een muis per tijdspunt, omdat de muizen duizenden crypten bevatten die we in elk individueel dier kunnen bestuderen. Tevens zullen wij het aantal muizen dat wij *in vivo* gebruiken aanzienlijk verminderen door het eerst testen van de drugs *in vitro.* Drugs die *in vitro* al niet werken zullen dan niet onnodig op muizen getest worden.

*Verfijning:* Voordat drugs aan de dieren gegeven zullen worden, zullen we deze eerste in vitro testen, waardoor er niet onnodig veel dieren gebruikt hoeven worden.

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

De muizen zullen gedurende het hele experiment zorgvuldig gemonitord worden op uiterlijk, houding, gedrag en activiteit. Als een muis aan een van de condities voldoet zoals beschreven bij de humane eindpunten, zal deze geëuthanaseerd worden.
De kans op nadelige milieueffecten zullen wij vermijden door volgens de DM-I (of DM-II wanneer nodig) regelgeving voor dierproeven te werken in het AMC. Om verdere risico's te beperken zullen slechts de geïsoleerde weefsels naar het laboratorium worden meegenomen, in dubbel afgesloten containers en worden geanalyseerd in ML-II laboratoria.

## 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.

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

**F. Huisvesting en verzorging**

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

☒ Nee

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

**G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

**H. Pijn en pijnbestrijding**

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Dieren kunnen pijn ervaren door injecties met tamoxifen of chemotherapie. Echter deze handeling zal niet langer dan twee seconden duren. Wij vinden daarom het ongerief dat de muis zou ervaren om onder narcose te gaan groter dan het ongerief van de injectie zelf.

Ook kunnen dieren bijwerkingen ervaren van de drugs. Als deze bijwerkingen vaker voorkomen zal de drug niet meer gebruikt worden, deze is dan ook niet geschikt voor een chemopreventie strategie.

Bij de validatie experimenten hopen wij een reductie in tumorgroei te zien bij toediening van een chemopreventie drug. Het is echter niet te uit te sluiten dat er tumoren zullen groeien in (vooral) de controle muizen en de muizen met chemopreventieve drugs. Tumorgroei in de darmen kan leiden tot pijn en hier zullen wij zorgvuldig op controleren (Zie I).

☐ 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?

Hanteren en fixeren t.b.v. I.p. injecties (Tamoxifen, bNF) → kortdurende stress
Hanteren en fixeren t.b.v. toeding drugs (chemotherapeutica/ inhibitors) → kortdurende stress
Mogelijke bijwerkingen van de drugs → verminderde eetlust/gewichtsverlies.
Eventuele tumorgroei in de darmen in de lange termijn validatie experimenten → obstipatie/verminderde eetlust/gewichtsverlies/anus prolaps/bloed in faeces.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het gebruik van biologische inhibitors kan leiden tot bijwerkingen omdat niet alleen tumorcellen door deze behandeling worden gedood, maar ook andere snel-delende weefsels hierdoor geraakt kunnen worden.
De validatie-experimenten duren tot maximaal 9 maanden na inductie van de constructen, het is mogelijk dat binnen deze periode tumoren kunnen ontstaan in de darm t.g.v. een geïnduceerde mutatie.

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

Op basis van *in vitro* experimenten, ervaringen uit eerdere *in* vivo experimenten en literatuurgegevens zullen we allereerst een dosis proberen te bepalen. Uiteindelijk willen we een optimale dosis vinden waarbij we een zo laag mogelijke dosering uitvoeren, zodat er slechts een groei-remmend effect op de tumor zal zijn en minimale effecten op gezonde weefsels. Mochten er toch bijwerkingen optreden, zoals gewichtsverlies door verminderde eetlust, zal de dosering aangepast worden, en eventueel zal de voeding worden verrijkt en weekgemaakt.

## 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.

Gewichtsverlies >15% binnen 2 dagen, OF gedurende een langere periode tov hoogst gemeten gewicht. Gedragskenmerken: slechte huidverzorging, kromme houding, op tenen lopen, verminderde mobiliteit, diarree, Mouse Grimace Scale score 3.

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

In experimenten set 1 worden geen drugs gebruikt dus hier zullen de muizen geen last van ondervinden. Aangezien de muizen zeer kort (max 60 dagen) in het experiment zitten is de kans op het ontwikkelen van darmkanker zeer klein. Het percentage uitval in deze groep wordt geschat op <5%.

In experimenten set 3 & 4 moet naast een zeer kleine kans op darmkanker formatie (>5%) rekening gehouden worden met bijwerkingen van de toegediende drugs. De effecten van de bijwerkingen zorgvuldig gemonitord zullen worden en de doseringen waar nodig worden aangepast. Het percentage uitval in deze groepen wordt geschat op <10%.

In experimenten set 5 zullen muizen langer in de proef zitten (max 9 maanden na i.p. Tamoxifen/bNF injectie). Deze dieren zullen gedurende het hele experiment drugs toegediend krijgen. Echter zijn deze drugs al getest voor hun optimale concentratie waarbij de minste bijwerkingen zullen optreden. Door de lange duur van het experiment is de kans op het ontstaan van darmkanker aanwezig in de experimentele groep die wél een mutatie heeft maar geen drugs ontvangt. Op basis van ervaring met soortgelijke experimenten verwachten we dat minder dan 10% van deze muizen vanwege een humaan eindpunt geofferd zal moeten worden.

## K. Classificatie van ongerief

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

| **Beschrijving procedure/groep** | **stammen** | **sexe** | **Aantal dieren** | **Ongerief (cumulatief)** | **Ongerief is een combinatie van de volgende procedures** |
|---|---|---|---|---|---|
| Experimenten set 1 | 20 | m/v | 160 | 160/2376= ~6,8% licht ongerief | Eenmalige I.P. injectie |
| Experimenten set 3 | 20 | m/v | 1216 | 1216/2376= ~51,2% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie Toediening + Bijwerkingen van drugs |
| Experimenten set 4 | 20 | m/v | 480 | 480/2376= ~20,2% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie Toediening + Bijwerkingen van drugs |
| Experimenten set 5A: Deze dieren krijgen drugs | 20 | m/v | 260 | 260/2376= ~10,9% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie<br><br>Deze dieren krijgen drugs toegediend die zijn |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| toegediend | | | | | getest op bijwerkingen. Echter, als de drugs geen effect hebben bestaat er een kans dat deze dieren darmkanker ontwikkelen tijdens het experiment |
| Experimenten set 5B: Deze dieren krijgen géén drugs toegediend | 20 | m/v | 260 | 260/2376= ~10,9%<br>matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie<br><br>Deze dieren hebben een grote kans om darmkanker te ontwikkelen tijdens het experiment |
| Total | 20 | m/v | 2376 | Licht 6,8%<br>Matig 93,2%<br>Ernstig 0% | |

## 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 het experiment zullen de darmen van de muis geïsoleerd worden. Dit kan alleen door de muis te doden.

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

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

☒ Ja

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 — Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden

3. Titel van de NTS — Strategieën tegen darmkanker

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 — 10 augustus 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 ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker). Deze hoofddoelstelling wordt bereikt door het beantwoorden van de volgende onderzoeksvragen:
De aanvragers richten zich vooral op 2 verschillende onderzoeksvragen:
1. *Hoe beïnvloeden darmkanker-geassocieerde mutaties de stamceldynamiek in de darmen?*

*2. Kunnen eerder beschreven chemopreventieve medicijnen de normale stamcellen beïnvloeden?*
*3. Hoe beïnvloeden deze chemopreventieve medicijnen de mutante kankerstamcellen?*
*4. Kan er een optimale dosis van deze medicijnen bepaald worden?*
*5. Kunnen deze medicijnen gebruikt worden om de kans op het ontstaan van darmkanker op lange termijn te verkleinen?*

De subvragen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van de onderzoeksgroep [redacted]. De personele bezetting en de financiële situatie voorzien verder in de behoeftes aangaande het voorgestelde onderzoek.

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 (fundamenteel en toegepast onderzoek) sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar kankerstamcellen. Tevens wordt er gezocht naar een strategie om de kans op het ontwikkelen van darmkanker te verkleinen. Dit onderzoek zal bijdragen aan een vermeerdering van fundamentele kennis over de kankerstamcelbiologie maar het gebruik van deze kennis in de kliniek zal in de toekomst liggen.

*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 ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker in een muizenmodel) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor mensen). Ondanks dat de toepassing van de verkregen kennis uit het voorgestelde onderzoek in de kliniek in de toekomst ligt, 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, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate (toekomstige) patiënten met darmkanker. Muizen zullen worden gedood om organoïden van darmen te kunnen kweken voor het onderzoek. Muizen zullen ook gebruikt worden om de ontwikkeling van darmtumoren te bestuderen en te onderzoeken of medicijnen dit kunnen remmen of voorkomen. 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 hun

nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere chemopreventieve strategie om het ontwikkelen van darmkanker te voorkómen in mensen.

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.

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.

   Er wordt eerst *in vivo* onderzocht of mutaties in darmstamcellen er voor zorgen dat deze cellen een voordeel hebben om uit te groeien in de darmcrypt ten opzichte van niet-gemuteerde gezonde stamcellen. Indien dit het geval is, wordt in organoïde kweek van darmen onderzocht of medicijnen deze uitgroei van de gemuteerde stamcellen kunnen remmen. Indien dit ook het geval is, zal het medicijn *in vivo* onderzocht worden op de capaciteit om deze uitgroei van mutante cellen te remmen. Vervolgens wordt een optimale dosis bepaald waarbij de mutante cellen geremd worden maar waarbij de gezonde cellen niet aangetast worden. Vervolgens wordt onderzocht of het medicijn in staat is om de ontwikkeling van een darmtumor op lange termijn tegen te houden.  De DEC is van mening dat deze onderzoeksstrategie kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

   *Welzijn dieren*

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

☐ 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 cumulatieve ongerief is geclassificeerd als licht ongerief voor de 60 muizen die gedood zullen worden voor het gebruik van hun darmen voor organoïde kweek. Het cumulatieve ongerief voor de muizen in de *in vivo* tumormodellen is ingeschat als matig. Dit ongerief ontstaat door bijwerkingen van de gebruikte medicijnen en de tumorgroei in de darmen. Echter in de experimenten set 1 worden geen medicijnen gebruikt en is de kans op het ontwikkelen van darmtumoren erg klein. Het ongerief in deze muizen blijft daardoor beperkt tot licht ongerief.

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 aangetast doordat er genetische modificaties plaatsvinden. Er wordt niet verwacht dat hierdoor direct sprake zal zijn van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. De uitgroei van tumoren kan wel leiden tot stress of pijn waardoor het gedrag wordt beïnvloed.

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 de humaan eindpunten zijn goed gedefinieerd volgens de DEC omdat dieren gedood worden als het lichaamsgewicht meer dan 15% afneemt (zowel in twee dagen als over een langere periode) of doordat ze gedragskenmerken vertonen waaruit blijkt dat ze ernstig ongerief kunnen hebben. De DEC oordeelt dat de HEPs ernstig ongerief ten gevolge van de tumorgroei of de bijwerkingen van de medicijnen zullen voorkomen. De DEC heeft geen reden om te twijfelen aan het geschatte percentage dieren dat hierdoor vroegtijdig uit de proef genomen zal worden, gezien de ervaring van de onderzoekers met dit type onderzoek.
    De onderzoekers hebben nog geen ervaring met het percentage dat vroegtijdig uit de

proef genomen wordt door bijwerkingen van de medicijnen. Ze schatten dit even hoog in als het percentage dieren dat door tumorvorming uit de proef genomen kan worden. De DEC is akkoord met deze inschatting omdat de medicijnen eerst in een organoïde kweek onderzocht zijn, waardoor de medicijnen die de gezonde stamcellen te sterk beïnvloeden in dit stadium al afvallen. De DEC ziet in dat het percentage een ruwe maar realistische schatting is.

*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 muizenmodel het meest accurate model is voor de complexe menselijke situatie voor de initiatie van darmkanker. Dit kan niet in een proefdiervrij model worden nagebootst.
Gezien de vraagstellingen van dit onderzoek vindt de DEC dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat voor dit type onderzoek een proefdiermodel nodig is en er 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)*.

De DEC oordeelt dat het aantal dieren realistisch is ingeschat op basis van de ervaring van deze groep. Voor de kortdurende experimenten hebben ze maar één muis nodig op zes tijdspunten om de stamceldynamiek in kaart te brengen. Uit ervaring weten ze dat twee extra muizen voldoende zijn om de inter-dier variatie te bepalen.
Voor de langere validatie studies met medicijnen hebben ze een powerberekening gedaan op basis van gegevens uit de literatuur.
De DEC oordeelt dat er met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt doordat er gebruik gemaakt wordt van een statische methode om het dieraantal te bepalen, er duizenden crypten per dier individueel bestudeerd kunnen worden en dat het testen van medicijnen eerst in organoïde kweek plaatsvindt voordat het in dieren onderzocht wordt.

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) het onderzoek deels gedaan wordt in organoïde kweken van de darm, deze aanpak bespaart veel ongerief in vergelijking met onderzoek in muizen met tumoren;
2) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven zo optimaal uit te voeren.
3) de gestelde HEPs de dieren zullen beschermen tegen het ondergaan van meer ongerief dan vooraf verwacht.

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 onderzoek aan de darmen.

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 ontwikkelen van een chemopreventieve strategie voor darmkanker, het gebruik van 2436 muizen die licht (9.0%) tot matig (91%) ongerief zullen ondergaan in dit onderzoek?*

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 ontwikkelen van een chemopreventieve strategie tegen darmkanker, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit mensen die het risico lopen om darmkanker te ontwikkelen doordat ze een bepaalde mutatie hebben. De kennis die

verkregen wordt in dit onderzoek kan op langere termijn bijdragen aan een betere therapie om het ontwikkelen van darmkanker te voorkómen.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze pijn en stress zullen ondergaan als gevolg van tumorvorming en/of bijwerkingen door de onderzochte medicijnen, een kleiner gedeelte van de muizen zal licht ongerief ondergaan doordat ze gedood worden voor het gebruik van hun darmen.

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 hun 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 bijdrage leveren aan een betere voorkoming van het ontwikkelen van darmkanker. Genetisch onderzoek wordt in de kliniek gebruikt om aan te tonen dat iemand een verhoogd risico heeft om darmkanker te ontwikkelen. Dit onderzoek voorziet in de behoefte dat er met een preventieve therapie gestart kan worden en zo de ontwikkeling van darmkanker kan worden tegenhouden. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 2436 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan 9% licht ongerief en 91% matig ongerief zal 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. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de stamceldynamiek van stamcellen met een bepaalde mutatie in het ontstaan van darmkanker en hoe met medicijnen (chemo) de uitgroei van deze stamcellen ten opzichte van gezonder stamcellen voorkomen kan worden. De verwachting is dat de inzichten uit dit onderzoek bij kunnen dragen aan een betere strategie om darmkanker te voorkomen in mensen met een mutatie waardoor ze gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van darmkanker. 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 onderliggende stamceldynamiek van stamcellen met mutaties die betrokken zijn bij darmkanker en hoe deze met medicijnen gecontroleerd kunnen worden, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het gebruik en het ongerief van maximaal 2436 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)*.

## Strategieën tegen darmkanker

De DEC is van mening dat het verkrijgen van meer inzicht in de stamceldynamiek van stamcellen met mutaties die betrokken zijn bij het ontstaan van darmkanker alsmede het onderzoeken van strategieën om tumorvorming te voorkomen, het gebruik en het licht (9%) tot matige (91%) ongerief dat 2436 muizen zullen ondergaan in dit onderzoek, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. Er wordt fundamentele kennis verkregen in de stamceldynamiek van gemuteerde stamcellen ten opzichte van gezonde stamcellen met behulp van marker-onafhankelijke labeling strategieën. Dit onderzoek richt zich op het beïnvloeden van deze dynamiek door middel van medicijnen. De aanvrager verwacht dat de resultaten zullen dienen als een "proof-of-principle" voor de humane situatie en daardoor vertaald kunnen worden naar de humane context. Het maatschappelijk belang is duidelijk. Ongeveer 5% van de darmkanker gevallen wordt veroorzaakt door een genetische afwijking. Er is behoefte aan een preventieve strategie om darmkanker te voorkomen in mensen met een verhoogde gevoeligheid. Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden met een specifieke mutatie. In deze muizen wordt bekeken of gemuteerde cellen voordeel hebben om uit te groeien ten opzichte van gezonde stamcellen. Vervolgens zal in een organoïde kweek van darmen onderzocht worden welke medicijnen in staat zijn om dit voordeel weg te nemen bij de gemuteerde cellen. In een in vivo model wordt naar de optimale dosis gezocht waarbij gemuteerde cellen niet meer de overhand nemen maar de gezonde stamcellen. Tenslotte zal het medicijn preventief worden toegediend om te onderzoeken of de tumorvorming langdurig onderdrukt kan worden. Het onderzoeken van het ontstaan van een tumor en het onderdrukken van de uitgroei van gemuteerde stamcellen kan niet in een proefdiervrij alternatief bestudeerd worden, zoals in een cellijn, omdat het een complexe interactie van verschillende celtypes in de darmcrypte structuur van de darm betreft. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar. De verschillende Go/No Go momenten geven duidelijk aan dat de volgende stap in het onderzoek alleen genomen wordt als het voorafgaande onderzoek dit rechtvaardigt.
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 onderzoek waar mogelijk uitgevoerd wordt in organoïde darmkweken. De dieren die hiervoor gebruikt worden ondergaan geen ongerief door experimentele handelingen. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de tumormodellen waardoor de DEC verwacht dat de monitoring op HEPs onverwacht ongerief zal voorkomen.
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 het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door een dier zo efficiënt mogelijk te gebruiken voor analyses aan duizenden individuele crypten. Ook zal de aanvrager gebruik maken van statistische methoden om het benodigd aantal dieren te bepalen. Dit onderzoek maakt geen gebruik van bijzondere categorieën dieren of dieren met een speciale herkomst. Ook is er geen speciale wet- en regelgeving van toepassing op dit project.

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

7.

> 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
AVD1180020172125

**Bijlagen**
2

Datum 1 september 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 augustus 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020172125. 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:**
1 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172125

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**
1 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172125

## 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 Duivendrecht |

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**
1 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172125

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

| | |
|---|---|
| Wat voor aanvraag doet u? | [x] Nieuwe aanvraag<br>[ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn<br>[ ] 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: | Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden |
| Titel niet-technische samenvatting: | Het ontwikkelen van darmkanker preventie strategieën |
| Naam DEC: | DEC AMC |
| Postadres DEC: | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres DEC: | [redacted] |

**Betaalgegevens**

| | |
|---|---|
| De leges bedragen: | € 1.187,- |
| De leges voldoet u: | na ontvangst van de factuur |

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | [redacted] |
| Plaats: | Amsterdam |
| Datum: | 1 september 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
AVD1180020172125

**Bijlagen**
2

Datum 1 september 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**
Factuurdatum: 1 september 2017
Vervaldatum: 1 oktober 2017
Factuurnummer: 172125
Ordernummer: Kostenplaats [redacted]

| **Omschrijving** | **Bedrag** |
|---|---|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1180020172125 | € 1.187,00 |

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

8.

[redacted])

**Van:** Info-zbo
**Verzonden:** woensdag 13 september 2017 11:47
**Aan:** [redacted]
**CC:** [redacted]
**Onderwerp:** AVD1180020172125: aanhouden beoordelen.

Geachte [redacted],

Op 31 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1180020172125. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U geeft in bijlage 3.4.4.2 aan dat er geen pijnbestrijding wordt toegepast, terwijl dieren wel pijn kunnen ondergaan. Voor de injecties is dit voldoende onderbouwd. Uit de aanvraag wordt echter niet duidelijk hoe gehandeld wordt als de dieren pijn ervaren door de groei van de tumoren. U wordt verzocht dit toe te lichten en, indien van toepassing, het niet verstrekken van pijnbestrijding te onderbouwen.

- De 3V's zijn grotendeels geschreven in het kader van vermindering. U geeft echter niet aan waarom geen gebruik gemaakt kan worden van een proefdiervrije methode (bijv. humane cellen) en bij 3.4.4.2. geeft u niet aan hoe aan de eisen van verfijning worden voldaan. Hetzelfde geldt voor de NTS. U wordt verzocht de 3V's 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)

9.

# 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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 2<br>Type dierproef: Muismodel voor darmkanker initiatie |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

Wij hebben gekozen voor het gebruik van muismodellen om de stamceldynamiek van gezonde en mutante stamcellen in de darm te bestuderen. De primaire keuze is gebaseerd op het feit dat wij de normale homeostase van de darm willen bestuderen over tijd, iets wat het makkelijkst kan worden gedaan met een muismodel. De muismodellen die wij ontwikkeld hebben en nog zullen ontwikkelen bevatten de volgende componenten:

1. Een darm-specifieke promotor met een induceerbare recombinase (zoals bijvoorbeeld $Cre^{ERT2}$)
2. Een darmkanker-geassocieerde mutatie die met behulp van een induceerbare recombinase tot expressie komt/zijn functie verliest.
3. Een (fluorescent) label waarmee we de geïnduceerde stamcellen kunnen volgen.

Het experiment zal worden gestart als een eenmalige tamoxifen (en bNF) injectie i.p. wordt toegediend. Door eerdere experimenten weten wij wat de optimale tamoxifen dosis is om ongeveer 1-5% van de stamcellen in de darm van een mutatie + kleurenlabel te voorzien. Als controle zullen wij een muismodel gebruiken waarbij na toediening van tamoxifen enkel een kleurlabel wordt gegeven aan de stamcellen. Vervolgens kunnen wij over tijd kwantificeren hoe snel deze mutante stamcel de andere gezonde stamcellen in de darmcrypt overneemt. Dit vergelijken wij met de 'normale' snelheid waarmee een normale stamcel andere stamcellen kan vervangen. De snelheid waarmee een darmcrypt volledig gevuld is met een kleurlabel is dan onze primaire uitkomstparameter

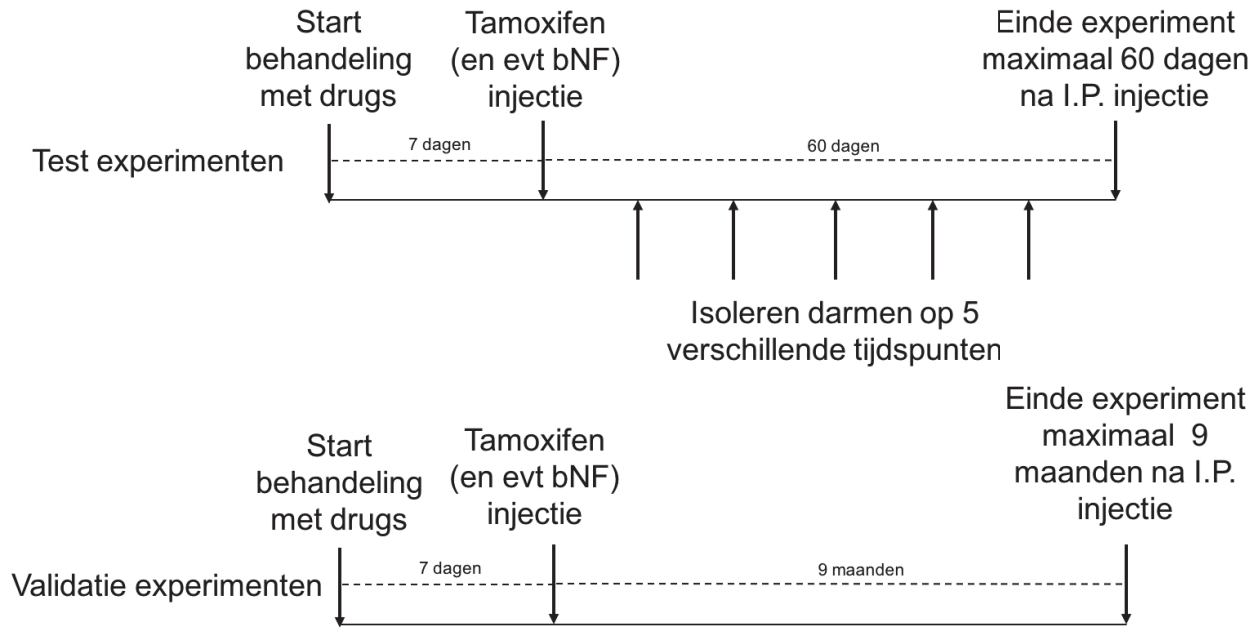
Aangezien de darmen van een muis honderdduizenden darmcrypten bevat, kunnen wij in duizenden crypten tegen gelijk onze primaire uitkomstparameter kwantificeren. In principe zullen dus na toevoeging van tamoxifen duizenden mini-experimentjes starten waardoor wij maar 1 muis per tijdspunt hoeven te

gebruiken.
Nog een voordeel van het gebruik van een muismodel is dat het vrijwel direct kan worden vertaald naar de humane setting. Dit komt omdat de stamceldynamiek in de muizen vergelijkbaar is met die van een mens.

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

Alle experimenten zullen de volgende handelingen bevatten (zie ook **figuur 1**):

- De muizen zullen eenmalig een i.p. injectie krijgen van 0.15mg tamoxifen (+ 40mg/kg bNF), afhankelijk van de promotor) in 50-100uL zonnebloemolie om het systeem aan te zetten.
- De muizen zullen op 5 verschillende tijdspunten geofferd worden. Vervolgens zullen de darmen van de muizen geïsoleerd worden voor verder onderzoek.
- Als de muizen drugs toegediend krijgen, zal de behandeling gestart worden binnen 1 week vóór de i.p. tamoxifen injectie, en vervolgd worden totdat de muis geofferd wordt. De dosering van de behandeling zal bepaald worden aan de hand van de meest recente literatuurgegevens en pilotexperimenten. De drugs zullen worden toegediend via de volgens literatuur beschreven juiste toedieningsweg die nooit meer dan licht ongerief zal geven. Per muismodel verwachten wij uiteindelijk 3 drugs te testen.
- De kortdurende experimenten zullen maximaal 60 dagen duren na toediening van tamoxifen
- De langdurende validatie experimenten zullen maximaal 9 maanden duren na toediening van tamoxifen. Tijdens deze experimenten kunnen de dieren premaligne darmtumoren ontwikkelen.




**Figuur 1.** Opzet van de experimenten.

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

Zoals hierboven beschreven zullen wij voor onze kortdurende experimenten (het kwantificeren van stamceldynamiek en het beïnvloeden van de stamceldynamiek) maar één muis per tijdspunt nodig hebben, aangezien we duizenden darmcrypten per muis individueel kunnen bestuderen. Het minimum aantal tijdspunten voor een correcte analyse is eerder bepaald aan de hand van het één-dimensionaal-neutraal-driftmodel [redacted]). Om het aantal stamcellen per crypt (*N*), de snelheid waarmee deze stamcellen elkaar vervangen (*lambda*), en de 'replacement bias' ($P_R$) te bepalen, hebben wij minimaal 5 tijdspunten nodig. Ook hebben wij getest of 3-4 tijdspunten genoeg kan zijn voor onze analyse maar met een CI van 95% konden wij geen accuraat resultaat behalen. Vijf tijdspunten is dus het minimaal aantal tijdspunten dat wij nodig hebben voor een accurate analyse.
Wij zullen naast deze 5 tijdspunten nog 1 tijdspunt toevoegen aan het eind van het experiment (maximaal 60 dagen na toediening van tamoxifen) om de drift parameters te kunnen valideren door een schatting te maken van het aantal gefixeerde crypten op dat tijdspunt met behulp van de eerdere tijdspunten. Om te

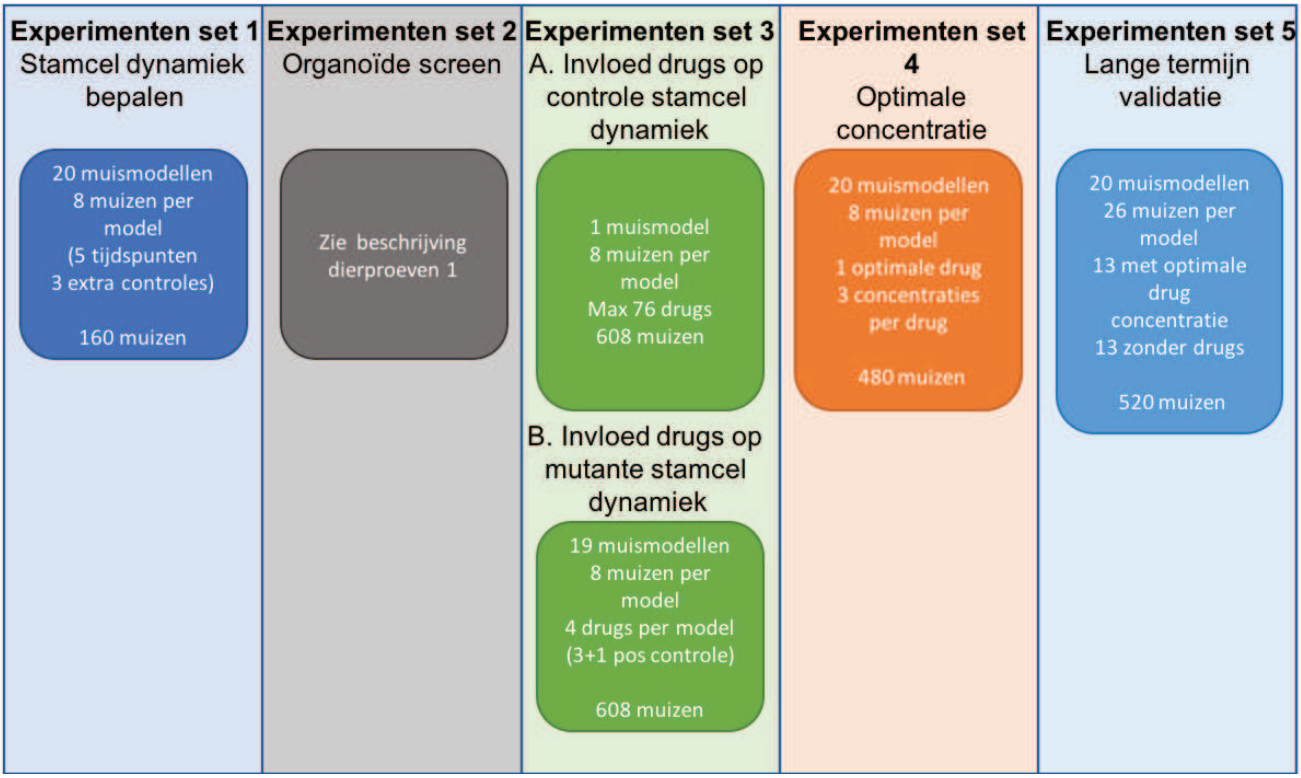
controleren of de i.p. injectie in alle muizen hetzelfde effect heeft (inter dier variatie) zullen wij per conditie nog twee extra muizen toevoegen die wij op één van de vijf tijdspunten zullen offeren. Dit aantal is genoeg gebleken uit onze eerdere experimenten [redacted]), we hoeven op deze manier geen twee muizen per tijdspunt te gebruiken om de inter dier variatie te onderzoeken.

Voor de langer durende validatie experimenten willen wij het verschil in aantal tumoren na 6-9 maanden per muismodel kwantificeren. Aan de hand van de literatuur hebben wij een powercalculatie gedaan om het aantal muizen per groep te bepalen. Om 30% verschil in tumor aantallen waar te nemen met een power van 0.8 en een p-waarde van 0.05 hebben wij 13 muizen per conditie per muismodel nodig.

**B. De dieren**

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

| | |
|---|---|
| Diersoort | Muis |
| Herkomst | Eigen fok |
| Geschatte aantal verschillende modellen | 20 |
| Geschatte aantal muizen per model | 125 |
| Geschatte aantal **totale muizen** | 2376 (**figuur 2** |
| Levensstadium | 6-12 weken bij start experiment |
| Geslacht | m/v |




De genotypes van de eerste muismodellen zijn al bekend en bevatten de volgende mutaties:

1. Controle muismodel → Intestinale promotor + fluorescent label
2. Apc $^{-/fl}$
3. Apc $^{fl/fl}$
4. Msh2 $^{-/fl}$
5. Msh2 $^{fl/fl}$
6. LSL-Kras$^{G12D}$
7. LSL-Pik3ca
8. PTEN $^{fl/fl}$

Deze muismodellen zijn al gemaakt, of worden op dit moment gegenereerd. Andere muismodellen die onder dit project zullen vallen hebben (1) mutaties die geassocieerd worden met genetische aanleg voor het

ontwikkelen van darmkanker (2) mutaties die veel voorkomen tijdens de ontwikkeling van darmkanker, of (3) een combinatie van darmkanker geassocieerde mutaties en zullen later kenbaar gemaakt worden.

**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*: Het gebruik van een muismodel voor de initiatie van darmkanker is de meest accurate nabootsing van de complexe menselijke situatie en is daarom op dit moment onvervangbaar. Wél kunnen wij drugs eerst testen op *in vitro* gekweekte organoïde culturen afkomstig van de darmen van de desbetreffende muizen. Alhoewel wij niet alle muizen kunnen vervangen voor organoïde kweken kunnen wij hiermee wel zeker het aantal gebruikte muizen verminderen (zie volgende sectie). Het volledig vervangen van muismodellen door een proefdiervrij alternatief zoals bijvoorbeeld humane cellijnen is helaas onmogelijk omdat wij kijken naar weefseldynamiek (de interactie tussen verschillende cellen en celtypen) en deze is niet na te bootsen in een cellijn setting.

*Vermindering:* Door goed onderbouwde statistische methoden te gebruiken voorafgaand aan de uitvoering van de experimenten, zal het aantal dieren tot een minimum beperkt blijven. Daarnaast zorgt constante evaluatie van de voorgaande experimenten dat er alleen zinvolle vervolg experimenten uitgevoerd zullen worden. Verder gebruiken wij in principe maar een muis per tijdspunt, omdat de muizen duizenden crypten bevatten die we in elk individueel dier kunnen bestuderen. Tevens zullen wij het aantal muizen dat wij *in vivo* gebruiken aanzienlijk verminderen door het eerst testen van de drugs *in vitro.* Drugs die *in vitro* al niet werken zullen dan niet onnodig op muizen getest worden.

*Verfijning:* Voordat drugs aan de dieren gegeven zullen worden, zullen we deze eerste in vitro testen, waardoor er niet onnodig veel dieren gebruikt hoeven worden. Tevens zijn onze muismodellen zodanig ontwikkelt en verfijnd dat wij alleen naar dynamiek kijken in vroeg stadium tumor ontwikkeling. Door deze premaligne tumor ontwikkeling zullen onze muizen vrijwel geen ongerief ondervinden.

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

De muizen zullen gedurende het hele experiment zorgvuldig gemonitord worden op uiterlijk, houding, gedrag en activiteit. Als een muis aan een van de condities voldoet zoals beschreven bij de humane eindpunten, zal deze geëuthanaseerd worden.
De kans op nadelige milieueffecten zullen wij vermijden door volgens de DM-I (of DM-II wanneer nodig) regelgeving voor dierproeven te werken in het AMC. Om verdere risico's te beperken zullen slechts de geïsoleerde weefsels naar het laboratorium worden meegenomen, in dubbel afgesloten containers en worden geanalyseerd in ML-II laboratoria.

## 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.

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

**F. Huisvesting en verzorging**

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

☒ Nee

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

**G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

**H. Pijn en pijnbestrijding**

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Dieren kunnen pijn ervaren door injecties met tamoxifen of chemotherapie. Echter deze handeling zal niet langer dan twee seconden duren. Wij vinden daarom het ongerief dat de muis zou ervaren om onder narcose te gaan groter dan het ongerief van de injectie zelf.

Ook kunnen dieren bijwerkingen ervaren van de drugs. Als deze bijwerkingen vaker voorkomen zal de drug niet meer gebruikt worden, deze is dan ook niet geschikt voor een chemopreventie strategie.

Bij de validatie experimenten hopen wij een reductie in tumorgroei te zien bij toediening van een chemopreventie drug. De tumoren die kunnen groeien door het aanzetten van mutaties in onze muismodellen zullen alleen van premaligne aard zijn. Het is echter niet uit te sluiten dat er premaligne tumoren zullen groeien in (vooral) de controle muizen en de muizen met chemopreventieve drugs. Uit ervaring lijdt deze premaligne tumorgroei in de darmen vrijwel nooit tot pijn. Indien er toch aanwijzingen zijn dat de dieren wel pijn/ongemak ondervinden (prolaps, anemie, veranderd gedrag, gewichtsverlies, etc Zie I); nemen we de dieren uit de proef.

☐ 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?

Hanteren en fixeren t.b.v. I.p. injecties (Tamoxifen, bNF) → kortdurende stress
Hanteren en fixeren t.b.v. toeding drugs (chemotherapeutica/ inhibitors) → kortdurende stress

Mogelijke bijwerkingen van de drugs → verminderde eetlust/gewichtsverlies.
Eventuele premaligne tumorgroei in de darmen in de lange termijn validatie experimenten → obstipatie/verminderde eetlust/gewichtsverlies/anus prolaps/bloed in faeces.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het gebruik van biologische inhibitors kan leiden tot bijwerkingen omdat niet alleen tumorcellen door deze behandeling worden gedood, maar ook andere snel-delende weefsels hierdoor geraakt kunnen worden.
De validatie-experimenten duren tot maximaal 9 maanden na inductie van de constructen, het is mogelijk dat binnen deze periode premaligne tumoren kunnen ontstaan in de darm t.g.v. een geïnduceerde mutatie.

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

Op basis van *in vitro* experimenten, ervaringen uit eerdere *in* vivo experimenten en literatuurgegevens zullen we allereerst een dosis proberen te bepalen. Uiteindelijk willen we een optimale dosis vinden waarbij we een zo laag mogelijke dosering uitvoeren, zodat er slechts een groei-remmend effect op de tumor zal zijn en minimale effecten op gezonde weefsels. Mochten er toch bijwerkingen optreden, zoals gewichtsverlies door verminderde eetlust, zal de dosering aangepast worden, en eventueel zal de voeding worden verrijkt en weekgemaakt.

## 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.

Gewichtsverlies >15% binnen 2 dagen, OF gedurende een langere periode tov hoogst gemeten gewicht.
Gedragskenmerken: slechte huidverzorging, kromme houding, op tenen lopen, verminderde mobiliteit, diarree, Mouse Grimace Scale score 3.

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

In experimenten set 1 worden geen drugs gebruikt dus hier zullen de muizen geen last van ondervinden. Aangezien de muizen zeer kort (max 60 dagen) in het experiment zitten is de kans op het ontwikkelen van darmkanker zeer klein. Het percentage uitval in deze groep wordt geschat op <5%.

In experimenten set 3 & 4 moet naast een zeer kleine kans op darmkanker formatie (>5%) rekening gehouden worden met bijwerkingen van de toegediende drugs. De effecten van de bijwerkingen zorgvuldig gemonitord zullen worden en de doseringen waar nodig worden aangepast. Het percentage uitval in deze groepen wordt geschat op <10%.

In experimenten set 5 zullen muizen langer in de proef zitten (max 9 maanden na i.p. Tamoxifen/bNF injectie). Deze dieren zullen gedurende het hele experiment drugs toegediend krijgen. Echter zijn deze drugs al getest voor hun optimale concentratie waarbij de minste bijwerkingen zullen optreden. Door de lange duur van het experiment is de kans op het ontstaan van premaligne darmkanker aanwezig in de experimentele groep die wél een mutatie heeft maar geen drugs ontvangt. Op basis van ervaring met soortgelijke experimenten verwachten we dat minder dan 10% van deze muizen vanwege een humaan eindpunt geofferd zal moeten worden.

## K. Classificatie van ongerief

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

| **Beschrijving procedure/groep** | **stammen** | **sexe** | **Aantal dieren** | **Ongerief (cumulatief)** | **Ongerief is een combinatie van de volgende procedures** |
|---|---|---|---|---|---|
| Experimenten set 1 | 20 | m/v | 160 | 160/2376= ~6,8% licht ongerief | Eenmalige I.P. injectie |
| Experimenten set 3 | 20 | m/v | 1216 | 1216/2376= ~51,2% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie Toediening + |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Bijwerkingen van drugs |
| Experimenten set 4 | 20 | m/v | 480 | 480/2376= ~20,2% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie Toediening + Bijwerkingen van drugs |
| Experimenten set 5A: Deze dieren krijgen drugs toegediend | 20 | m/v | 260 | 260/2376= ~10,9% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie<br><br>Deze dieren krijgen drugs toegediend die zijn getest op bijwerkingen. Echter, als de drugs geen effect hebben bestaat er een kans dat deze dieren premaligne darmkanker ontwikkelen tijdens het experiment |
| Experimenten set 5B: Deze dieren krijgen géén drugs toegediend | 20 | m/v | 260 | 260/2376= ~10,9% matig ongerief | Eenmalige I.P. injectie<br><br>Deze dieren hebben een grote kans om premaligne darmkanker te ontwikkelen tijdens het experiment |
| Total | 20 | m/v | 2376 | Licht 6,8%<br>Matig 93,2%<br>Ernstig 0% | |

## 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 het experiment zullen de darmen van de muis geïsoleerd worden. Dit kan alleen door de muis te doden.

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

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

☒ Ja

Centrale Commissie Dierproeven

10.

> 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
AVD1180020172125
**Bijlagen**
1

Datum 28 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 31 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden" met aanvraagnummer AVD1180020172125. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u vragen gesteld over het gebruik van pijnbestrijding en de 3V's. U heeft als antwoord 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 "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 31 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).

[redacted]

**Datum:**
28 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172125

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 "Ontwikkeling van darmkanker preventie strategieën door kanker stamcel dynamiek te beïnvloeden" met aanvraagnummer AVD1180020172125, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 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. 31 augustus 2017, ontvangen op 31 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. Isolatie darmen voor organoïde kweek** | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 60 | 100% Licht | |
| **3.4.4.2. Muismodel voor darmkanker initiatie** | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 2.376 | 93% Matig 7% Licht | |

**Voorwaarden**

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

**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172125

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:**
AVD1180020172125

# 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* | 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] | |
| 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<br>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<br>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
| 2.2 | Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is? | ☐ 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 | 1 - 1 - 2023 |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek | |
| 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 [redacted] |
| | | E-mailadres | [redacted]@amc.uva.nl |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

| | |
|---|---|
| Naam | [redacted] |
| Functie | [redacted] |
| 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 |
| 1.3 | Vul de titel van het project in. | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |

## 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.

Infecties met de parasiet *Toxoplasma gondii* komen wereldwijd veel voor. Met het toenemen van de

leeftijd worden ook veel Nederlanders met deze parasiet geïnfecteerd. Vaak verlopen deze infecties asymptomatisch. Een deel van de geïnfecteerden ondervindt echter wel ernstige gevolgen van de infectie. Dit betreft in het bijzonder vrouwen die zwanger zijn en een primo-infectie met toxoplasma tijdens de zwangerschap doormaken, en patiënten waarbij de immunologische afweer verzwakt is.
Bij vrouwen die een primaire toxoplasma infectie oplopen tijdens de zwangerschap kan de parasiet naar het kind overgaan met als gevolg congenitale toxoplasmose, waarbij zeer ernstige afwijkingen bij het kind kunnen ontstaan. Bij patiënten met immunosuppressie, onder andere HIV patiënten en transplantatiepatiënten, kan reactivatie van de toxoplasma infectie in (b.v.) de hersenen aanleiding geven tot ernstige neurologische afwijkingen en het overlijden van de patiënt.
Diagnostiek naar toxoplasmose bij de mens vindt primair plaats door het aantonen van antistoffen tegen de parasiet in het serum.
Een van de eerste serologische testen die hiervoor ontwikkeld werd is de Sabin-Feldman (SF) test. Met deze SF- test kunnen antilichamen tegen de parasiet *Toxoplasma gondii* in bloed, liquor en traanvocht worden aangetoond. De SF-test heeft een unieke combinatie van zeer hoge sensitiviteit en specificiteit met daarbij de mogelijkheid om de hoogte van de (IgG) antilichaamrespons nauwkeurig te kwantificeren. Er is, wereldwijd, geen andere serodiagnostische test voor toxoplasmose die deze kenmerken heeft. De basis voor de unieke eigenschappen van de SF-test ligt in het gebruik van *levende* toxoplasma-parasieten in de test die, in de praktijk, alleen d.m.v. een kweek in muizen verkregen worden.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is om toxoplasma parasieten te verkrijgen voor uitvoering van de Sabin Feldman test d.m.v. kweek in muizen. Deze parasieten zijn noodzakelijk voor diagnose van Toxoplasma infecties middels de Sabin Feldman test. Het is van groot maatschappelijk belang om deze test uit te voeren, zie 3.3. De procedure zoals beschreven is een betrouwbare procedure om de benodigde parasieten te verkrijgen.

### 3.3 Belang

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

Het is van maatschappelijk belang om bij patiënten met specifieke klinische problemen serodiagnostiek naar toxoplasma infectie te verrichten door middel van de Sabin-Feldman test. De SF-test heeft een unieke combinatie van zeer hoge sensitiviteit en specificiteit met daarbij de mogelijkheid om de hoogte van de (IgG) antilichaamrespons nauwkeurig te kwantificeren waarmee resultaten verkregen worden die niet met andere testen te verkrijgen zijn.
Als top-referent medisch centrum worden in het AMC regelmatig patiënten gezien met zeer lastige problematiek rondom *toxoplasmose in de zwangerschap* en bij *immunosuppressie.* Analyses bij deze patiënten, mede met de SF-test, maken het mogelijk optimale informatie te verkrijgen en zorg te verlenen. De expertise op het gebied van toxoplasmose aanwezig in het AMC wordt, mede op basis van data verkregen met de SF- test, ook ter beschikking gesteld aan andere gezondheidscentra / laboratoria in Nederland waar deze problematiek gezien wordt. Het AMC is het enige centrum in Nederland waar de test uitgevoerd wordt.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De Sabin Feldman techniek kan alleen uitgevoerd worden met *levende* parasieten, in het bijzonder wanneer de populatie parasieten 95-100% levend is. Alleen met een muizenkweek kan aan deze eis voldaan worden.

De muis is een gevoelige diersoort voor infectie met Toxoplasma. Voor praktische toepassing van de test moet deze tenminste 3 maal per week uitgevoerd worden. Hiervoor en voor het doorenten van de stam zijn minimaal 9 muizen per week nodig. De muizen krijgen Toxplasma parasieten toegediend in de buikholte. Na 2-3 dagen zijn de parasieten zodanig in aantal toegenomen dat muizen geëuthanaseerd worden en de Toxoplasma parasieten uit de buikholte worden opgenomen en in de SF-test gebruikt. Parasieten verkregen uit muizen die ernstig ziek zijn, zijn ongeschikt voor de SF-test. De periode dat de muizen ernstig ongerief is mede hierom kort gehouden.

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 gaat hier om de kweek van toxoplasma parasieten waarmee met de SF test serodiagnostiek naar toxoplasmose verricht kan worden.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De kweek is geslaagd als de dieren niet ernstig ziek zijn bij de oogst en de verkregen parasieten populatie uit 95-100% levende parasieten bestaat.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|---|---|
| 1 | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |
| 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 | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |
| 1.2 | Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | Toxoplasma, parasieten, Sabin Feldman, muis |

## 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)

Het hoofddoel van dit project is om bij patiënten met specifieke klinische problemen zoals bij Toxoplasma infecties in de zwangerschap, waarbij congenitale infecties kunnen optreden, en Toxoplasma infectie bij patiënten waarbij het immuunsysteem wordt onderdrukt, de ziekte te diagnosticeren. Daarvoor kan met een specifieke zeer gevoelige test naar toxoplasma, de Sabin-Feldman (SF) test, specifieke antilichaamresponsen aangetoond worden. In deze test worden levende toxoplasma-parasieten gebruikt die uit muizen verkregen worden. Deze test wordt sinds 2003 in het AMC uitgevoerd.
De SF-test is wereldwijd dé referentie techniek voor de serodiagnostiek van Toxoplasma, en wordt in referentie centra in meerdere landen toegepast.
Met deze SF-test kunnen *antilichamen* tegen de parasiet *Toxoplasma gondii* in lichaamsvloeistoffen (bloed, liquor, traanvocht) worden aangetoond.

| | | |
|---|---|---|
| | | De SF-test heeft een unieke combinatie van zeer hoge sensitiviteit en specificiteit met daarbij de mogelijkheid om de hoogte van de (IgG) antilichaamrespons nauwkeurig te meten. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Als top-referent medisch centrum worden in het AMC regelmatig patiënten gezien met zeer lastige problematiek rondom toxoplasmose in de zwangerschap en bij mensen met een onderdrukking van het immuunsysteem. Analyses bij deze patiënten, met o.a. de SF-test, maken het mogelijk optimale informatie te verkrijgen en daarmee zorg te verlenen. Gebruik van de SF-test en de bijbehorende expertise op het gebied van toxoplasmose in het AMC, heeft ook een r[redacted] voor andere gezondheidscentra/laboratoria in Nederland. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Er zijn 9 muizen per week nodig, dus 468 muizen per jaar. Voor een periode van 5 jaar gaat het om maximaal 2375 muizen. |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Muizen worden geïnfecteerd met Toxoplasma parasieten. De totale periode die de muizen geïnfecteerd zijn met de parasiet is 2 tot maximaal 3 dagen. Parasieten verkregen uit muizen die ernstig ziek zijn, zijn ongeschikt voor de SF-test dus het is zowel voor de test als voor de muizen van belang om de tijd tussen het begin van het ongerief en opoffering zo kort mogelijk te houden. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Matig. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | 2-3 dagen na toediening van de Toxoplasma parasieten, worden de dieren geëuthanaseerd waarna de parasieten uit de buikholte worden geoogst. |

## **4** Drie V's

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | **Vervanging**<br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | T.a.v. uitvoering van de SF-test: een alternatief voor parasieten uit muizen is om parasieten dmv een weefselkweek te verkrijgen. Deze mogelijkheid is door ons uitvoerig bestudeerd maar niet bruikbaar gebleken. De parasieten voor de SF-test moeten vrijwel allemaal (95-100%) levend zijn als ze in de test gebruikt worden. Met parasieten uit een kweek blijkt dat tot nu toe niet mogelijk. De oogst bevat veel dode parasieten. Onze afdeling blijft uitzien naar een bruikbaar alternatief voor de muizen, maar vooralsnog is de kweek van parasieten in muizen de enige werkbare optie voor de SF-test.<br><br>T.a.v. andere diagnostische testen. De SF –test heeft een sensitiviteit, specificiteit en mogelijkheid tot kwantificeren van antilichaamrespons bij toxoplasmose die met geen enkele andere test bereikt wordt. |
| 4.2 | **Vermindering**<br>Leg uit hoe kan worden | Het benodigde aantal muizen is, in samenwerking met ervaren biotechnici de afgelopen jaren tot het kleinst mogelijke aantal teruggebracht (9 per |

| | | |
|---|---|---|
| | verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | week). Bij gebruik van minder muizen is de parasieten-opbrengst niet toereikend voor zowel het overenten als uitvoeren van de SF-test. |
| 4.3 | **Verfijning**<br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | De muis is een zeer gevoelige diersoort voor infectie met Toxoplasma. De kweek-opbrengst per muis is zeer hoog waardoor zo weinig mogelijk dieren gebruikt kunnen worden. Verfijning is niet meer mogelijk. Pijnbestrijding is geprobeerd maar veroorzaakte meer symptomen bij de muizen en minder levende parasieten. |
| | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Ze worden in groepen gehuisvest. Na infectie worden de muizen maximaal 3 dagen gehouden. Indien muizen naar oordeel van de biotechnicus zichtbaar ziek zijn worden ze gedood onder anesthesie. |

## **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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 3.4.4.1<br>Type dierproef: Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

Toxoplasma parasieten worden ingespoten in de buikholte van muizen waar ze zich vervolgens vermenigvuldigen. Na euthanasie van de dieren worden de parasieten uit de buikholte opgenomen. De procedure is succesvol als de verkregen parasieten 95-100% levend zijn. Hiermee zijn de parasieten geschikt voor gebruik in de SF test.

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

Muizen worden geïnfecteerd met een minimale hoeveelheid Toxoplasma parasieten in de buikholte. Volume volgens Diehl et al. 2001. De totale periode dat de muizen geïnfecteerd zullen zijn met de parasiet is 2 tot maximaal 3 dagen.

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

Statistische overwegingen zijn niet van toepassing. Er zijn 9 muizen per week nodig om voldoende levende parasieten te hebben voor diagnostiek.

**B. De dieren**

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

Er zullen NMRI muizen van het vrouwelijk geslacht in de leeftijdsrange van 7-9 weken gebruikt worden. De keuze voor vrouwelijke muizen is met het oog op de sociale huisvesting. Er wordt geen gebruik gemaakt van mannelijke muizen vanwege het agressieve gedrag na infectie met de toxoplasma parasiet en de verstoring van het immuunsysteem wat de groei van parasieten negatief beïnvloedt. Dit is in het verleden bestudeerd en aangetoond. Bij gebruik van mannelijke muizen in de toxoplasma kweek, zullen de

mannelijke muizen solitair gehuisvest moeten worden wat matig ongerief met zich meebrengt.
Bij gebruik van minder muizen is de parasiet-opbrengst niet toereikend voor het overenten en uitvoeren van de Sabin Feldman test. Negen muizen per week = 468 muizen per jaar X 5 jaar = 2340 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:
t.a.v. uitvoering van de SF-test: een alternatief voor parasieten uit muizen is om parasieten dmv een weefselkweek te verkrijgen. Deze mogelijkheid is door ons uitvoerig bestudeerd maar niet bruikbaar gebleken. De parasieten voor de SF-test moeten vrijwel allemaal (95-100%) levend zijn als ze in de test gebruikt worden. Met parasieten uit een weefselkweek blijkt dat tot nu toe niet mogelijk. De oogst bevat veel dode parasieten. Onze afdeling blijft uitzien naar een bruikbaar alternatief voor de muizen, maar vooralsnog is de kweek van parasieten in muizen de enige werkbare optie voor de SF-test.
T.a.v. andere diagnostische testen: De SF–test heeft een sensitiviteit, specificiteit en mogelijkheid tot kwantificeren van antilichaamrespons bij toxoplasmose die met geen enkele andere test bereikt wordt. Hier is dus geen alternatief voorhanden.

Vermindering
De muis is een zeer gevoelige diersoort voor infectie met Toxoplasma. De kweek-opbrengst per muis is zeer hoog, zodat zo weinig mogelijk dieren gebruikt kunnen worden voor een goede opbrengst.
Het benodigde aantal muizen is, in samenwerking met ervaren biotechnici de afgelopen jaren tot het kleinst mogelijke aantal teruggebracht (9 per week). Bij gebruik van minder muizen is de parasieten-opbrengst niet toereikend voor zowel het overenten als uitvoeren van de SF-test.

Verfijning:
Verfijning is niet meer mogelijk. Pijnbestrijding is geprobeerd maar veroorzaakte meer symptomen bij de muizen en minder levende parasieten.

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

De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Ze worden in groepen gehuisvest in individueel geventileerde kooien in DMII niveau dierverblijven. Na infectie worden de muizen maximaal 3 dagen gehouden. Indien muizen naar het oordeel van de biotechnicus zichtbaar ziek zijn worden ze getermineerd en afgevoerd.

## 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.

n.v.t.

## 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?

ip spuiten van de parasieten in medium, anesthesie voor doden

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

**J. Humane eindpunten**

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Indien er bij een muis meerdere symptomen, open vacht, bolle rug, knijpen met de ogen en verminderde activiteit/mobiliteit zichtbaar worden, is er sprake van een humaan eindpunt. In dat geval wordt deze muis getermineerd en afgevoerd.

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

0.01%

### K. Classificatie van ongerief

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

Matig voor alle dieren

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De muizen worden eerst geëuthanaseerd om vervolgens de Toxoplasma parasieten uit de buikholte te kunnen oogsten. In leven laten van de muizen zou de muizen ziekteverschijnselen geven omdat de parasieten aanwezig blijven

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.

# 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 Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek

3. Titel van de NTS Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek

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 juli 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 (Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek). Het doel van dit project is om toxoplasma parasieten te verkrijgen voor uitvoering van de Sabin Feldman test d.m.v. kweek in muizen. Deze parasieten zijn noodzakelijk voor diagnose van Toxoplasma infecties middels de Sabin Feldman test. De procedure zoals beschreven is een betrouwbare procedure om de benodigde parasieten te verkrijgen. De aanvraag is toetsbaar en een navolgbaar geheel. Het gaat om handelingen bij

muizen die meer dan 25 jaar worden toegepast om levende parasieten in muizen te kweken. Het project is dan ook zeker haalbaar, afgaande op de ervaring van deze medewerkers met deze technieken..

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 het beste aan bij de hoofddoelstelling. Het kan gezien worden als translationeel onderzoek gedaan omdat de parasieten gekweekt in muizen gebruikt kunnen worden om antilichamen tegen toxoplasma parasieten in de mens aan te tonen, daardoor kan de diagnose met zekerheid kan gesteld worden waar die vanwege het onderdrukte immuunsysteem van de patiënten de standaard methode geen uitkomst biedt.

*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 (Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek.) is tevens het uiteindelijke doel van dit project.

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 translationele project dat gericht is op Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten met een aangetast immuunsysteem met klachten die wijzen op een Toxoplasma infectie. De muizen die worden geïnjecteerd met levende parasieten en zullen daar enig hinder van hebben. De artsen die de test gebruiken om de diagnose te stellen, kunnen hun werk goed uitvoeren en bij patiënten Toxoplasma-infectie vaststellen waar die in de standaard in vitro test niet aangetoond kan worden.

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 techniek.

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 sluit logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie is al 25 jaar hetzelfde en geeft de meeste kans op om zoveel mogelijk levende parasieten met zo weinig mogelijk leed voor de muizen te produceren. De Sabin Feldman techniek kan alleen uitgevoerd worden met levende parasieten, in het bijzonder wanneer de populatie parasieten 95-100% levend is. Alleen met een parasietenkweek in muizen kan aan deze eis voldaan worden. De muis is een gevoelige diersoort voor infectie met Toxoplasma. Voor succesvolle praktische toepassing met de gekweekte parasieten, moet de productie in muizen tenminste 3 maal per week uitgevoerd worden. Hiervoor en voor het door enten van de stam zijn wekelijks muizen nodig. De muizen krijgen Toxoplasma parasieten toegediend in de buikholte. Na 2-3 dagen zijn de parasieten zodanig in aantal toegenomen dat muizen gedood kunnen worden en de Toxoplasma parasieten uit de buikholte worden opgenomen en in de SF-test gebruikt

   *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 en heeft geen reden om te twijfelen aan de percentages dieren die matig ongerief zullen ondergaan.

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 zodanig aangetast 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 zodanig gedefinieerd dat een dier niet meer dan het maximaal verwachte ongerief kan ondergaan. De onderzoekers verwachten dat er geen dieren voortijdig zullen worden gedood omdat de procedure standaard en gecontroleerd wordt uitgevoerd. De afgelopen jaren zijn er geen dieren voortijdig gedood vanwege ongerief dat hoger was dan anders. Gezien de ervaring van de onderzoeksgroep en de medewerkers van de dierfaciliteit met de beschreven technieken, heeft de DEC geen reden om hieraan te twijfelen.

    *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 ipv parasieten uit muizen, in de toekomst mogelijk dmv weefselkweek verkregen zouden kunnen worden. Deze mogelijkheid wordt elders in een gespecialiseerd lab. Op het AMC is de kennis en een dergelijk lab niet aanwezig. Er worden tot nu toe onvoldoende levende parasieten in vitro gekweekt en dus zijn deze parasieten nog niet bruikbaar gebleken. De parasieten voor de SF-test moeten vrijwel allemaal (95-100%) levend zijn als ze in de laboratorium-test gebruikt kunnen worden. De afdeling heeft wel contacten met het lab die de in vitro-kweek proberen te verbeteren en blijft zo uitzien naar een bruikbaar alternatief voor de muizen, maar vooralsnog is de kweek van parasieten in muizen de enige werkbare optie voor de SF-test.De SF–test heeft een sensitiviteit, specificiteit en mogelijkheid tot kwantificeren van antilichaamrespons bij toxoplasmose die met geen enkele andere test bereikt wordt.

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

    Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van het aantal dieren dat deze onderzoeksgroep de afgelopen 25 jaar per jaar nodig had en dus ook de komende 5 jaar nodig zal 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 criteria gesteld voor een HEP zullen voorkomen dat dieren meer ongerief zullen ondergaan, dan vooraf is ingeschat;
2) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de technieken met zo min mogelijk ongerief te kunnen uitvoeren;
3) Pijnbestrijding is geprobeerd maar veroorzaakte meer symptomen bij de muizen en minder levende parasieten.

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).*
De keuze voor vrouwelijke muizen is met het oog op de sociale huisvesting. Er wordt geen gebruik gemaakt van mannelijke muizen vanwege het agressieve gedrag na infectie met de toxoplasma parasiet en mogelijk de verstoring van het immuunsysteem wat de groei van parasieten negatief beïnvloedt. Dit is in het verleden bestudeerd en aangetoond.

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 omdat ze anders pijn zullen krijgen van het achter blijven van levende parasieten in de buik. Het doden van de dieren voorkomt dit leed.

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?
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).*
   De centrale morele vraag is of er muizen gebruikt kunnen worden voor de kweek van toxoplasma parasieten in hun buik om zo levende parasieten te leveren voor een diagnostische laboratorium-test met de levende parasieten zodat bij immuun-gecompromitteerde patiënten kan worden aangetoond dat ze een Toxoplasma infectie hebben.

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 translationele project zijn de proefdieren en de patiënten met een verzwakt immuunsysteem die worden verdacht een Toxoplasma infectie te hebben.

   De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze stress en pijn kunnen ondergaan van de handelingen en de groei van parasieten in hun buik

   De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers omdat het referent medisch centrum in het AMC regelmatig patiënten krijgen uit heel Nederland met zeer lastige problematiek rondom *toxoplasmose in de zwangerschap* en doordat bij deze patiënten immunosuppressie aanwezig is. Deze patiënten kunnen met deze test als nog worden gediagnostiseerd. Het AMC kan met deze test het [redacted] van Nederland behouden.

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

   De centrale morele vraag is of er muizen gebruikt kunnen worden voor de kweek van toxoplasma parasieten in hun buik om zo levende parasieten te leveren voor een diagnostische laboratorium-test met de levende parasieten zodat bij immuun-gecompromitteerde patiënten kan worden aangetoond of ze een Toxoplasma infectie hebben

   De DEC is van mening dat het belang van het kweken van Toxoplasma parasieten het matige ongerief dat 2340 muizen zullen ondergaan, rechtvaardigt.

   Het wetenschappelijk belang van de dierproeven ontbreekt, maar van het behouden en toepassen van de Sabin Feldman-test in een [redacted] is Nederland is wel aanwezig. De resultaten van de verschillende mondiale referentie-laboratoria

worden met elkaar uitgewisseld en vergeleken. Het is van maatschappelijk belang om bij patiënten met specifieke klinische problemen serodiagnostiek naar toxoplasma infectie te verrichten door middel van de Sabin-Feldman test. De SF-test heeft een unieke combinatie van zeer hoge sensitiviteit en specificiteit met daarbij de mogelijkheid om de hoogte van de (IgG) antilichaamrespons nauwkeurig te kwantificeren waarmee resultaten verkregen worden die niet met andere testen (in vitro) te verkrijgen zijn.
Als top-referent medisch centrum worden in het AMC regelmatig patiënten gezien met zeer lastige problematiek rondom toxoplasmose in de zwangerschap en bij immunosuppressie. Analyses bij deze patiënten, mede met de SF-test, maken het mogelijk optimale informatie te verkrijgen en zorg te verlenen. De expertise op het gebied van toxoplasmose aanwezig in het AMC wordt, mede op basis van data verkregen met de SF- test, ook ter beschikking gesteld aan andere gezondheidscentra / laboratoria in Nederland waar deze problematiek gezien wordt. Het AMC is het enige centrum in Nederland waar de test uitgevoerd wordt. .

De DEC acht het zeer aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met deze kweek. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de aanvragers veel ervaring en kennis bezitten over de technieken en de formulering van het humane eindpunt voorkomt dat dieren meer ongerief zullen ondergaan dan vooraf is ingeschat.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele aanpak leidt tot het behalen van de doelstelling. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. 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.

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergstraat 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
AVD1180020172327

**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 "Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020172327. 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:**
AVD1180020172327

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**
4 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172327

## 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: | Meibergstraat 31 |
| Postcode en plaats: | 1105 AZ AMSTERDAM |
| IBAN: | NL68RABO0136166741 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer: | AMC Amsterdam |

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**
4 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
NVWA180020172327

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

| | |
|---|---|
| Geplande startdatum: | 1 januari 2018 |
| Geplande einddatum: | 1 januari 2023 |
| Titel project: | Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |
| Titel niet-technische samenvatting: | Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |
| Naam DEC: | DEC AMC |
| Postadres DEC: | 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<br>[x] Beschrijving Dierproeven<br>[x] Niet-technische samenvatting |
| Overige bijlagen: | [x] DEC-advies |

**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 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
AVD1180020172327

**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<br>Betreft aanvraag AVD1180020172327 | € 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.

Centrale Commissie Dierproeven

7.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergstraat 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
AVD1180020172327

Datum 11 augustus 2017
Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 2 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek" met aanvraagnummer AVD1180020172327. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

**Niet technische samenvatting**
De titel van de NTS is niet voor een leek duidelijk, evenals de woorden congenitale infecties, serodiagnostiek en liquor (3.1); de laatste alinea van 4.1 en overenten (4.2). Daarnaast moet een NTS anoniem zijn en er staat meerdere malen de naam van de aanvrager in. Tot slot komt het aantal dieren niet overeen met het aantal in de aanvraag.
Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin dit is aangepast?

**Onduidelijkheden**
In het projectvoorstel geeft u aan "De periode dat de muizen ernstig ongerief is mede hierom kort gehouden" (3.4). In de Bijlage Dierproeven staat dat de dieren matig ongerief zullen ondervinden. Zal er sprake zijn van ernstig ongerief? Kunt u dit dan in een nieuwe Bijlage Dierproeven aangeven en hoeveel (aantal of procentueel) dieren dat betreft?

U geeft aan dat pijnbestrijding meer ongerief oplevert en minder parasieten.

In de Bijlage Dierproeven geeft u onder H aan dat er geen pijn wordt verwacht, ondanks dat er in het verleden wel pijnbestrijding heeft plaatsgevonden. Kunt u dit uitleggen en indien er wel pijn wordt verwacht, kunt u dit in een nieuwe Bijlage Dierproeven onder H aangeven, met een onderbouwing waarom u geen toepast of welke pijnverlichtingsmethoden u toepast.

**Datum:**
11 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172327

**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

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Melding bijlagen

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: AVD1180020172327

**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:**
11 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172327

## 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

8.

t.a.v Centrale commissie dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

Uw kenmerk: AVD1180020172327

15 augustus 2017

Betreft: Aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte leden,

Met deze brief reageren we op we op de onduidelijkheden die u bent tegengekomen in onze aanvraag met titel: Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek.

De NTS is aangepast zoals u hebt aangegeven en het aantal dieren is veranderd naar 2340 zoals ook verantwoord in de vergunningaanvraag. De taal is verbeterd en onduidelijke termen zoals 'congenitale' is vervangen door 'aangeboren', 'serodiagnostiek' is omschreven door 'vast stellen van de ziekte' en 'liquor' is vervangen door 'hersenvloeistof' zodat de NTS nu beter te begrijpen is. De NTS is geanonimiseerd.

Ten aanzien van de onduidelijkheden het volgende: De zin 'de periode dat de muizen ernstig ongerief is mede hierom kort gehouden' Is vervangen door de zin: de periode dat de dieren matig ongerief hebben, is mede hierom kort gehouden. Deze classificatie van het ongerief is veranderd en in overeenstemming gebracht met de classificatie van het ongerief in de bijlage. Het ongerief voor de dieren was in het oude classificeringssysteem voor een deel van de dieren 'ernstig' omdat het groeien van de parasieten in enkele gevallen kortdurend ziekte veroorzaakte. Dit ongerief wordt in de nieuwe classificering omdat het kortdurend is, als 'matig' geclassificeerd. Dit was in de bijlage in overleg met de IvD wel aangepast maar in het projectvoorstel niet.

In de bijlage is H op uw aanwijzing aangepast. Dit was inderdaad niet goed aangegeven. Excuses hiervoor. De dieren kunnen wel pijn ervaren, maar pijnbestrijding kan niet toegepast worden omdat de dieren daar meer symptomen van ziekte van krijgen en er minder levende parasieten kunnen worden geoogst. Het toepassen van pijnbestrijding is enkele jaren geleden samen met de proefdierdeskundige uitgezocht.

Het aangepaste projectvergunningsvoorstel en de bijlage zijn toegevoegd.

Met vriendelijke groet,

Mede namens [redacted],

Namens de vergunninghouder AMC,

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

9.

# 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. | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |

## 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.

Infecties met de parasiet *Toxoplasma gondii* komen wereldwijd veel voor. Met het toenemen van de

leeftijd worden ook veel Nederlanders met deze parasiet geïnfecteerd. Vaak verlopen deze infecties asymptomatisch. Een deel van de geïnfecteerden ondervindt echter wel ergere gevolgen van de infectie. Dit betreft in het bijzonder vrouwen die zwanger zijn en een primo-infectie met toxoplasma tijdens de zwangerschap doormaken, en patiënten waarbij de immunologische afweer verzwakt is.
Bij vrouwen die een primaire toxoplasma infectie oplopen tijdens de zwangerschap kan de parasiet naar het kind overgaan met als gevolg congenitale toxoplasmose, waarbij zeer ernstige afwijkingen bij het kind kunnen ontstaan. Bij patiënten met immunosuppressie, onder andere HIV patiënten en transplantatiepatiënten, kan reactivatie van de toxoplasma infectie in (b.v.) de hersenen aanleiding geven tot ernstige neurologische afwijkingen en het overlijden van de patiënt.
Diagnostiek naar toxoplasmose bij de mens vindt primair plaats door het aantonen van antistoffen tegen de parasiet in het serum.
Een van de eerste serologische testen die hiervoor ontwikkeld werd is de Sabin-Feldman (SF) test. Met deze SF- test kunnen antilichamen tegen de parasiet *Toxoplasma gondii* in bloed, liquor en traanvocht worden aangetoond. De SF-test heeft een unieke combinatie van zeer hoge sensitiviteit en specificiteit met daarbij de mogelijkheid om de hoogte van de (IgG) antilichaamrespons nauwkeurig te kwantificeren. Er is, wereldwijd, geen andere serodiagnostische test voor toxoplasmose die deze kenmerken heeft. De basis voor de unieke eigenschappen van de SF-test ligt in het gebruik van *levende* toxoplasma-parasieten in de test die, in de praktijk, alleen d.m.v. een kweek in muizen verkregen worden.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is om toxoplasma parasieten te verkrijgen voor uitvoering van de Sabin Feldman test d.m.v. kweek in muizen. Deze parasieten zijn noodzakelijk voor diagnose van Toxoplasma infecties middels de Sabin Feldman test. Het is van groot maatschappelijk belang om deze test uit te voeren, zie 3.3. De procedure zoals beschreven is een betrouwbare procedure om de benodigde parasieten te verkrijgen.

### 3.3 Belang

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

Het is van maatschappelijk belang om bij patiënten met specifieke klinische problemen serodiagnostiek naar toxoplasma infectie te verrichten door middel van de Sabin-Feldman test. De SF-test heeft een unieke combinatie van zeer hoge sensitiviteit en specificiteit met daarbij de mogelijkheid om de hoogte van de (IgG) antilichaamrespons nauwkeurig te kwantificeren waarmee resultaten verkregen worden die niet met andere testen te verkrijgen zijn.
Als top-referent medisch centrum worden in het AMC regelmatig patiënten gezien met zeer lastige problematiek rondom *toxoplasmose in de zwangerschap* en bij *immunosuppressie.* Analyses bij deze patiënten, mede met de SF-test, maken het mogelijk optimale informatie te verkrijgen en zorg te verlenen. De expertise op het gebied van toxoplasmose aanwezig in het AMC wordt, mede op basis van data verkregen met de SF- test, ook ter beschikking gesteld aan andere gezondheidscentra / laboratoria in Nederland waar deze problematiek gezien wordt. Het AMC is het enige centrum in Nederland waar de test uitgevoerd wordt.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De Sabin Feldman techniek kan alleen uitgevoerd worden met *levende* parasieten, in het bijzonder wanneer de populatie parasieten 95-100% levend is. Alleen met een muizenkweek kan aan deze eis voldaan worden.

De muis is een gevoelige diersoort voor infectie met Toxoplasma. Voor praktische toepassing van de test moet deze tenminste 3 maal per week uitgevoerd worden. Hiervoor en voor het doorenten van de stam zijn minimaal 9 muizen per week nodig. De muizen krijgen Toxplasma parasieten toegediend in de buikholte. Na 2-3 dagen zijn de parasieten zodanig in aantal toegenomen dat muizen geëuthanaseerd worden en de Toxoplasma parasieten uit de buikholte worden opgenomen en in de SF-test gebruikt. Parasieten verkregen uit muizen die ernstig bleken te ziek zijn, zijn ongeschikt voor de SF-test. De periode dat de muizen matig ongerief is mede hierom kort gehouden.

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 gaat hier om de kweek van toxoplasma parasieten waarmee met de SF test serodiagnostiek naar toxoplasmose verricht kan worden.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

De kweek is geslaagd als de dieren niet ernstig ziek zijn bij de oogst en de verkregen parasieten populatie uit 95-100% levende parasieten bestaat.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|---|---|
| 1 | Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |
| 2 | |
| 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. | 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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 3.4.4.1<br>Type dierproef: Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

Toxoplasma parasieten worden ingespoten in de buikholte van muizen waar ze zich vervolgens vermenigvuldigen. Na euthanasie van de dieren worden de parasieten uit de buikholte opgenomen. De procedure is succesvol als de verkregen parasieten 95-100% levend zijn. Hiermee zijn de parasieten geschikt voor gebruik in de SF test.

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

Muizen worden geïnfecteerd met een minimale hoeveelheid Toxoplasma parasieten in de buikholte. Volume volgens Diehl et al. 2001. De totale periode dat de muizen geïnfecteerd zullen zijn met de parasiet is 2 tot maximaal 3 dagen.

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

Statistische overwegingen zijn niet van toepassing. Er zijn 9 muizen per week nodig om voldoende levende parasieten te hebben voor diagnostiek.

**B. De dieren**

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

Er zullen NMRI muizen van het vrouwelijk geslacht in de leeftijdsrange van 7-9 weken gebruikt worden. De keuze voor vrouwelijke muizen is met het oog op de sociale huisvesting. Er wordt geen gebruik gemaakt van mannelijke muizen vanwege het agressieve gedrag na infectie met de toxoplasma parasiet en de verstoring van het immuunsysteem wat de groei van parasieten negatief beïnvloedt. Dit is in het verleden bestudeerd en aangetoond. Bij gebruik van mannelijke muizen in de toxoplasma kweek, zullen de

mannelijke muizen solitair gehuisvest moeten worden wat matig ongerief met zich meebrengt.
Bij gebruik van minder muizen is de parasiet-opbrengst niet toereikend voor het overenten en uitvoeren van de Sabin Feldman test. Negen muizen per week = 468 muizen per jaar X 5 jaar = 2340 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:
t.a.v. uitvoering van de SF-test: een alternatief voor parasieten uit muizen is om parasieten dmv een weefselkweek te verkrijgen. Deze mogelijkheid is door ons uitvoerig bestudeerd maar niet bruikbaar gebleken. De parasieten voor de SF-test moeten vrijwel allemaal (95-100%) levend zijn als ze in de test gebruikt worden. Met parasieten uit een weefselkweek blijkt dat tot nu toe niet mogelijk. De oogst bevat veel dode parasieten. Onze afdeling blijft uitzien naar een bruikbaar alternatief voor de muizen, maar vooralsnog is de kweek van parasieten in muizen de enige werkbare optie voor de SF-test.
T.a.v. andere diagnostische testen: De SF–test heeft een sensitiviteit, specificiteit en mogelijkheid tot kwantificeren van antilichaamrespons bij toxoplasmose die met geen enkele andere test bereikt wordt. Hier is dus geen alternatief voorhanden.

Vermindering
De muis is een zeer gevoelige diersoort voor infectie met Toxoplasma. De kweek-opbrengst per muis is zeer hoog, zodat zo weinig mogelijk dieren gebruikt kunnen worden voor een goede opbrengst.
Het benodigde aantal muizen is, in samenwerking met ervaren biotechnici de afgelopen jaren tot het kleinst mogelijke aantal teruggebracht (9 per week). Bij gebruik van minder muizen is de parasieten-opbrengst niet toereikend voor zowel het overenten als uitvoeren van de SF-test.

Verfijning:
Verfijning is niet meer mogelijk. Pijnbestrijding is geprobeerd maar veroorzaakte meer symptomen bij de muizen en leverde minder levende parasieten.

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

De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Ze worden in groepen gehuisvest in individueel geventileerde kooien in DMII niveau dierverblijven. Na infectie worden de muizen maximaal 3 dagen gehouden. Indien muizen naar het oordeel van de biotechnicus zichtbaar ziek zijn worden ze getermineerd en afgevoerd.

## 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.

n.v.t.

## 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.

Pijnbestrijding in de vorm van buprenorfine en NSAIDs is geprobeerd olv de proefdierdeskundige maar veroorzaakte meer symptomen bij de muizen en leverde minder levende parasieten op.

☐ 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?

ip spuiten van de parasieten in medium, anesthesie voor doden

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

**J. Humane eindpunten**

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Indien er bij een muis meerdere symptomen, open vacht, bolle rug, knijpen met de ogen en verminderde activiteit/mobiliteit zichtbaar worden, is er sprake van een humaan eindpunt. In dat geval wordt deze muis getermineerd en afgevoerd.

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

0.01%

**K. Classificatie van ongerief**

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

Matig voor alle dieren

## Einde experiment

**L. Wijze van doden**

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

☐ Nee

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

De muizen worden eerst geëuthanaseerd om vervolgens de Toxoplasma parasieten uit de buikholte te kunnen oogsten. In leven laten van de muizen zou de muizen ziekteverschijnselen geven omdat de parasieten aanwezig blijven

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

11.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum
[redacted]
Meibergstraat 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
AVD1180020172327
**Bijlagen**
1

Datum 20 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 "Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek" met aanvraagnummer AVD1180020172327. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is een nieuwe NTS aangeleverd en in het Projectvoorstel en de Bijlage Dierproeven is het ongerief in overeenstemming met elkaar gebracht en pijnbestrijding onderbouwd.

**Beslissing**
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Datum:**
20 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172327

**Procedure**
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 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.
Er is door u stilgestaan bij mogelijkheden om alternatieven te benutten en dit is door de CCD meegenomen in de ethische afweging. De CCD heeft geconcludeerd dat deze alternatieven momenteel niet voorhanden zijn, maar verwacht van u dat u bij de uitvoering van dit project pro actief blijft in de ontwikkeling en toepassing van alternatieven.
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]

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: | Meibergstraat 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 "Kweek van Toxplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek" met aanvraagnummer AVD1180020172327, 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 2 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 augustus 2017, ontvangen op 2 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 augustus 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---|---|---|
| **3.4.4.1 Kweek van Toxoplasma tachyzoieten t.b.v. de Sabin Feldman techniek** | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 2.340 | Matig | |

**Voorwaarden**

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

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

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

**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172327

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:**
AVD1180020172327

# 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.

2348

1.

29 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.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 |
| 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] |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |

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

| | |
|---|---|
| (Titel) Naam en voorletters | |
| 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<br>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<br>Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3 |
| 2.2 | Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is? | ☐ Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| | | ☐ Nee > Ga verder met vraag 3 |
| 2.3 | Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend? | ☐ Nee > Ga verder met vraag 3 |
| | | ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6 |

## 3 Over uw project

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3.1 | Wat is de geplande start- en einddatum van het project? | Startdatum | 0 1 - 0 1 - 2 0 1 8 |
| | | Einddatum | 3 1 - 1 2 - 2 0 2 2 |
| 3.2 | Wat is de titel van het project? | Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart | |
| 3.3 | Wat is de titel van de niet-technische samenvatting? | Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval | |
| 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 € 1.035,00 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☑ Na ontvangst van de factuur

# 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☒ Melding Machtiging

☐

# 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

| | |
|---|---|
| Naam | [redacted] |
| Functie | [redacted] |
| Plaats | Amsterdam |
| Datum | 20 - 03 - 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. | Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart |

## 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.

Recent genetisch onderzoek heeft aangetoond dat variatie in DNA sequenties van het genoom

samenhangt met de kans om een bepaalde ziekte of afwijking te ontwikkelen (obesitas, suikerziekte, hoge bloeddruk, ritmestoornissen, etc.). Zo hebben "genome-wide association studies" (GWAS) nucleotide variaties (SNPs; single nucleotide polymorphisms) in de bevolking gevonden die zijn geassocieerd met hartfunctie (bepaald door middel van ECG) en ziekteverloop na schade (infarct). Deze variaties in het genoom blijken meestal in niet-eiwit coderend DNA te zitten. Ons genoom bestaat voor 98% uit niet-coderend DNA dat elementen bevat die bepalen wanneer, waar en hoe sterk genen tot expressie komen. De varianten hebben waarschijnlijk een invloed op de functie van zulke regulatoire DNA elementen.

Terwijl GWAS studies het grote belang van regulatoir DNA voor ziekteprocessen in de mens onweerlegbaar hebben vastgesteld, laten deze studies niet zien 1) welke specifieke varianten de ziektekans beïnvloeden en 2) hoe deze varianten de functie van organen beïnvloeden ( , Daarnaast is de functie van dat regulatoire DNA in de regulatie van genexpressie, orgaanontwikkeling, homeostase en ziekteverloop na hartschade nog nauwelijks begrepen. Een belangrijk aspect hierbij is dat het onbekend is welke genen door de regulatoire elementen (uit de GWAS) worden gereguleerd en op welke manier, terwijl juist deze kennis nodig is voor het begrip van het ziektemechanisme en eventueel daaruit voorkomende aangrijpingspunten oplevert voor voorspelling, diagnose of behandeling.

Dit onderzoek richt zich specifiek op het achterhalen van de functie van regulatoire elementen en genen in hartontwikkeling en hun rol in boezemfibrilleren (5/1000 mensen; 6% van mensen van 75 jaar en ouder; met verhoogde kans op herseninfarct), kamer-ritmestoornissen (plotse hartdood) en aangeboren hartafwijkingen (7/1000 pasgeborenen; in Nederland 65.000 totaal en 1300-1400 per jaar) en na een hartinfarct (dagelijks krijgen 80 mensen een hartinfarct waarvan er 15 overlijden). Daarnaast ontwikkelen veel mensen ritmeproblemen zoals bradycardie als gevolg van falen van geleidingssysteem onderdelen (bijvoorbeeld sinusknoop).

Volgens de laatste inzichten worden deze hartziektes veroorzaakt door een combinatie van verschillende mutaties/varianten in genen en regulatoire DNA elementen, al dan niet in samenspel met omgevingsfactoren. Daarnaast is er een onverwacht grote overeenkomst gevonden in de genen en variatiegebieden die geassocieerd zijn met hartontwikkeling, ritmestoornissen en hartziekten. Zo veroorzaakt variatie in boezemfibrilleren en geleidingsvertraging, veroorzaken (aangeboren hartafwijkingen) en ritmestoornissen, en veroorzaken volledige verstoring van hart en geleidingssysteem ontwikkeling ( Dit voorbeeld laat ook het grote dosis afhankelijke effect zien van een en hetzelfde genproduct op het fenotype. Een ander voorbeeld van een gen gevonden in Genome Wide Association Studies (GWAS) dat betrokken is bij hartritmeregulatie en hartontwikkeling is Deze factor is tevens een klinisch relevante biomarker voor hartfalen. Wanneer het gen volledig wordt uitgeschakeld ontstaan hartafwijkingen ), maar wanneer het gen alleen in endocard cellen wordt uitgeschakeld, ontwikkelen de muizen ritmestoornissen, mitraalklep afwijkingen en hartfalen ( ). Wanneer in de cardiomyocyten wordt uitgeschakeld ontwikkelen de muizen normaal maar gaan ze binnen enkele dagen na een geïnduceerd hartinfarct plotseling dood. Dit snelle beloop van de ziekte kan worden ondervangen door een collageen-patch geïmpregneerd met eiwit op het infarct aan te brengen ). GWAS hebben genetische varianten geïdentificeerd die een verband laten zien tussen hartinfarct en ventriculaire ritmestoornissen ).

Hartontwikkeling en herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. In muizenpups tot een leeftijd van 7 dagen na de geboorte regenereert het hart volledig na een hartinfarct of apex resectie ). Ook in de mensen lijkt deze regeneratieve response tijdens de eerste levensjaren te bestaan, aangezien een baby met een massief hartinfarct herstelde zonder enige restschade ( In oudere dieren is deze regeneratieve response sterk verlaagd, waardoor in het infarct niet voldoende nieuwe hartspiercellen worden gevormd maar een litteken Volwassen hartspiercellen blijken wel terug te vallen op hartontwikkelingsmechanismen, maar

slagen er toch niet in om te regenereren. Echter, recent onderzoek heeft laten zien dat geforceerde activering van hartontwikkelingsfactoren zoals [redacted] resulteert in sterk toegenomen regeneratie van het beschadigde volwassen hart.

De muis is een goed model voor het bestuderen van genetische factoren die een rol spelen bij de ontwikkeling van organen zoals het hart, en bij ziektes zoals hart- en vaatziekten. Daarbij kunnen ziektes en aangeboren afwijkingen in de mens veroorzaakt door modificaties in het genoom gemodelleerd worden in genetisch gemodificeerde muizen. Recent hebben we gevonden dat een enkele nucleotide variant ([redacted] die veel voorkomt in de populatie (4 op de 10 mensen zijn heterozygote drager) de activiteit van een [redacted] (gen voor belangrijkste natriumkanaal in het hart) verstoort. Hierdoor bleek de expressie van [redacted] verlaagd te worden en de gevoeligheid voor ritmestoornissen toe te nemen ([redacted]). Dit onderzoek illustreert het translationele karakter van dit fundamentele onderzoek. Van een variant uit GWAS studies (mens) wordt in in vitro en in diermodellen (muis) vastgesteld dat, en vervolgens hoe, deze de functie van het hart beïnvloedt. Momenteel wordt bekeken of de variant in de kliniek kan worden meegenomen in de risicobepaling voor bepaalde fatale ritmestoornissen. Dit onderzoek vond noodzakelijkerwijs deels plaats in muizenmodellen, omdat deze elementen functioneren in een strikt weefsel en context afhankelijke manier die niet betekenisvol nagebootst kan worden in cel/weefselkweek.

Het hier beschreven onderzoek is fundamenteel van karakter, maar zal ook leiden naar toegepast onderzoek. We bestuderen de rol van genen en (mogelijk) regulatoire elementen in de ontwikkeling, functie, ziekte verloop en regeneratie van het muizenhart, voor en na de geboorte. Specifieke genen/elementen worden gemodificeerd in muizen om het mechanisme van hun functie te bestuderen, en te extrapoleren naar hun functie in de mens. Aangezien tegenwoordig met behulp van CRISPR/Cas9 zeer efficiënte genetische modificaties in het genoom van de muis gemaakt kunnen worden, kunnen er modellen gemaakt worden met dezelfde genetische afwijkingen die in patiënten gevonden worden. Met behulp van deze techniek kan er effectief onderzoek naar aangeboren hartafwijkingen en hart- en vaatziektes plaatsvinden. We verwachten mechanismen en genen te vinden die door menselijk handelen kunnen worden beïnvloed ("druggable"), en zich dus lenen voor de ontwikkeling van behandelingen.

### 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 doel van dit project is om genetische elementen ([redacted]) te identificeren die nodig zijn voor de ontwikkeling en de (elektrische) functie van het hart, en het onderliggende mechanisme van hun functie te achterhalen en de regeneratieve respons na een hartinfarct. Daarmee leren we hoe bepaalde hartafwijkingen, ritmestoornissen en verschillen in ziekteverloop ontstaan, en hoe en waarom bepaalde in de bevolking voorkomende genetische variaties / mutaties hartafwijkingen, ritmestoornissen en verschillen in herstel na hartschade veroorzaken. Uiteindelijk resulteert dit in verbeterde bepaling van risico en diagnose, en in inzicht in onderliggende mechanismen en identificatie van betrokken genen waarop behandeling ontwikkeld kan worden.

We richten ons specifiek op 5 doelgebieden:
1. de functie van het geleidingssysteem. Het geleidingssysteem bestaat uit weefsels die het elektrische signaal maken en doorgeven aan de boezems en kamers, en zo tempo en coördinatie van samentrekken bepalen.
2. de functie van het atrium en boezemfibrillatie. Boezemfibrilleren kent verschillende oorzaken waarvan het onderliggende mechanisme slechts deels of niet begrepen is.
3. gevoeligheid voor ritmestoornissen van de kamers, met name de rechterkamer uitstroom, waar bij de

mens veel ritmestoornissen ontstaan.
4. het ontstaan van aangeboren hartafwijkingen. Dit betreft zowel structurele afwijkingen (zoals verkeerde aansluiting grote slagaders op het hart) als de aanleg tot ritmestoornissen (bijvoorbeeld kamer pre-excitatie).
5. Regeneratie na hartschade. Tijdens een hartinfarct sterven door een lokale afsluiting van een coronairvat hartspiercellen, die bijna niet regenereren maar grotendeels worden vervangen door littekenweefsel.

De modificaties die we willen bestuderen worden gemaakt op basis van humaan genetische studies, zoals GWAS, waarin varianten en mutaties gevonden zijn die hartfunctie en ontwikkeling beïnvloeden/verstoren. We zullen beginnen met de belangrijkste varianten en mutaties die afwijkingen veroorzaken uit de literatuur, ons netwerk of onze eigen genetische studies. [redacted], [redacted]. Additionele regio's zullen volgen. Van al deze gebieden wordt op basis van literatuur en ons vooronderzoek verwacht dat ze een rol spelen in de regulatie van deze en andere genen die nodig zijn voor het reguleren van hartontwikkeling, prikkelgeleiding en geleidingssysteem functie.

**Haalbaarheid**:
We hebben inmiddels meer dan 20 jaar ervaring met het maken en onderzoeken van genetisch gemodificeerde muizen, verkregen via klassieke modificatie methoden (via gemodificeerde embryonale stamcellen, directe DNA injecties in zygoten) en recent (sinds 2 jaar) via gene editing (TALEN; CRISPR-Cas9). Een van onze analisten is gespecialiseerd in het uitvoeren van de operatie waarbij door middel van het afbinden van de kransslagader (LAD) hartinfarct wordt geïnduceerd. Voor alle voorgestelde experimenten is de benodigde expertise en financiering aanwezig. Verder hebben wij en anderen reeds aangetoond dat bepaalde varianten in regulatoir DNA en mutaties in genen zowel aangeboren hartafwijkingen, ritmestoornissen als een gewijzigd ziekteverloop kunnen veroorzaken (zie punt **3.1 Achtergrond**). We kunnen niet voorspellen of, en op wat voor manier het genomische element van interesse betrokken is bij de bovenbeschreven ziektebeelden. Wel zullen we aan de hand van bioinformatische analyse en in vitro experimenten deze elementen voorselecteren om de kans dat ze belangrijk blijken te zijn te verhogen. We schatten in dat de voorgestelde proeven haalbaar zijn om te doen omdat ze passen bij een groepsgrootte van ongeveer 5 verschillende onderzoekers (AIO's, postdocs en analisten). 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:
Aangeboren hartafwijkingen behoren tot de meest-voorkomende aangeboren afwijkingen (7/1000 pasgeborenen; in Nederland 65.000 totaal en 1300-1400 per jaar). Daarnaast ontwikkelen veel mensen ritmeproblemen zoals bradycardie (te trage hartslag als gevolg van natuurlijke pacemaker of atrioventriculaire knoop defecten), kamerfibrilleren (met plotse dood tot gevolg) of boezem fibrilleren (5/1000 mensen; 6% van mensen van 75 jaar en ouder) met verhoogde kans op herseninfarct. Dagelijks krijgen 80 mensen een hartinfarct waarvan het ziekteverloop sterk varieert en er zelfs 15 overlijden. Identificatie van de veroorzakende varianten (en mutaties) geeft de mogelijkheid om de kans op ziekte te voorspellen. Identificatie van de genen/genproducten die beïnvloed worden en een rol spelen bij de ziekteprocessen bieden aanknopingspunten voor het verbeteren van prognose en behandelingsmethoden.

Wetenschappelijk belang:
Deze klinische problemen hebben als overeenkomst dat de kans op het ontwikkelen ervan sterk wordt

beïnvloed door variaties in ons genoom, en dat de variaties worden gevonden in overeenkomstige gebieden van het genoom. Variaties en mutaties die deze ziektes veroorzaken worden intensief gezocht. Echter, deze studies leren ons niet welke variaties er wel en niet toe doen, en hoe de variaties die er wel toe doen hun effect veroorzaken. Deze lacune tussen variatiedetectie en mechanismebegrip verhindert gebruik van deze kennis. Het beantwoorden van deze vragen maakt het mogelijk om te achterhalen welke genproducten een rol spelen in deze ziekten, en via welk mechanisme.

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 die toonaangevend zijn in het cardiovasculaire, ontwikkelings- en genetisch 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 of de EU. 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

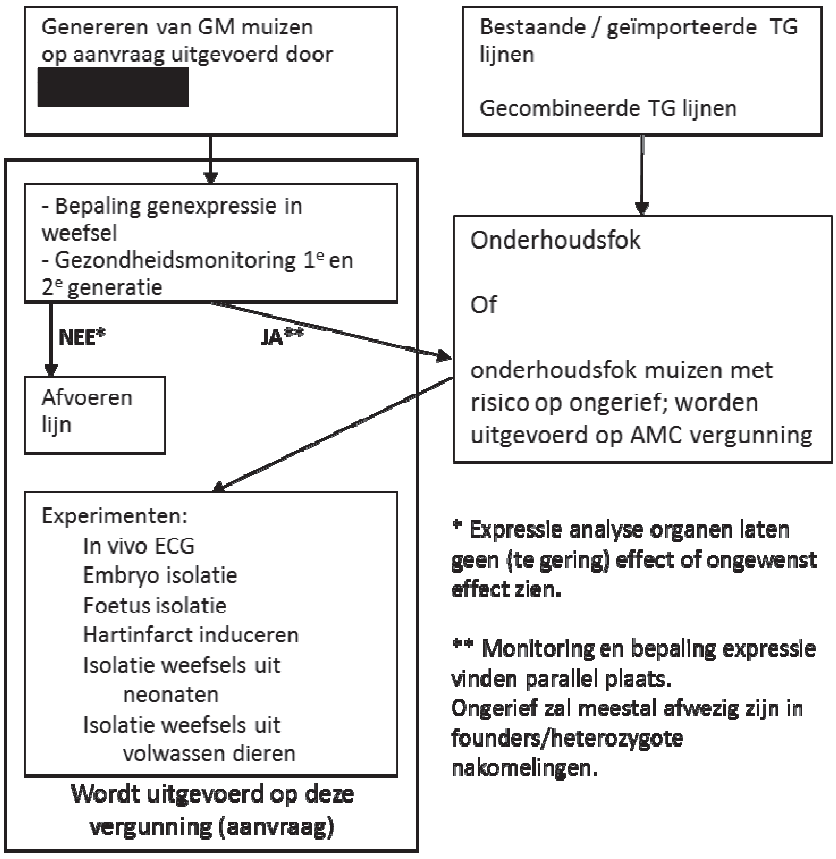
3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

De onderzoekstrategie wordt weergegeven in figuur 1.

Humaan genetische onderzoeken (GWAS, mutatie screens etc.) ontdekken klinisch relevante varianten en mutaties [redacted]). Deze varianten/mutaties verstoren mogelijk hartontwikkeling of hartfunctie. We zullen met behulp van bioinformatica een voorspelling doen over de mogelijke functie van deze varianten / mutaties. We richten ons op vijf gerelateerde onderwerpen: geleidingssysteem functie, boezemfibrilleren, kamer-ritmestoornissen, aangeboren hartafwijkingen en regeneratie na hartschade.

Voorts zullen we door middel van genome editing (CRISPR/Cas9) een gewenste verandering in het genoom van de muis aanbrengen. [redacted]. Het genereren van transgene lijnen wordt uitgevoerd door de [redacted]. Voor de injecties is een vergunning. Muizenlijnen met reeds vervaardigde bruikbare modificaties zullen geïmporteerd worden.

Met behulp van genotypering (PCR) wordt het aantal founders vastgesteld onder de pups die geboren worden uit de geïnjecteerde zygoten. Deze founders worden overgedragen op dit protocol voor verdere karakterisering van de lijnen. Deze muismodellen zijn heterozygoot voor het transgen en hebben mogelijk al wel een kleine (meetbare) verandering in genexpressie, maar doorgaans geen merkbaar effect op fenotype (en welzijn). Van elk type modificatie willen we minimaal twee onafhankelijke lijnen onderzoeken om te bevestigen dat het fenotypische effect veroorzaakt wordt door de modificatie, en niet door "off target" modificaties die kunnen ontstaan bij het toepassen van CRISPR/Cas9 (tot nu toe rapporteert de literatuur weinig problemen met onverwachte merkbare fenotypische effecten als gevolg van eventuele off target modificaties, hetgeen ook blijkt uit onze eigen ervaring; tientallen lijnen gegenereerd, geen bijeffect waargenomen).




Figuur 1.

Onder deze vergunning wordt de gezondheid van de muizen van de 1e en 2e generatie fok van de gegenereerde lijn gemonitord om vast te stellen of de genetische modificatie ongerief voor de muizen oplevert. Als er geen ongerief wordt vastgesteld, wordt de lijn verder gefokt. Als er wel ongerief wordt vastgesteld dan zal de lijn verder gefokt worden op de generieke AMC-vergunning voor fokken met risico op ongerief. Lijnen die worden geïmporteerd of worden gecombineerd van bestaande lijnen gaan direct naar onderhoudsfok.

Voor nieuw-gegenereerde lijnen geldt dat ze al worden onderzocht als heterozygoot gedurende de gezondheidsmonitoring (dus 1 gemodificeerd allel, 1 wildtype allel). Weefsels wordt geïsoleerd waarna genexpressieniveaus en expressiepatronen worden bepaald van een panel van voor die modificatie specifieke genen. Als geen verandering in genexpressie aanwezig is, zal de lijn getermineerd worden. Als genexpressie wel is veranderd dan zullen vervolgexperimenten gedaan worden die afhangen van het verwachte effect van de aangebrachte genetische modificatie en de uitslag van het initiële onderzoek.

De experimentele opzet zorgt voor een minimum aan ongerief; De lijnen worden gekruist om homozygote nakomelingen te genereren (fokprotocol [redacted] Bij de dieren wordt eerst een ECG afgenomen en vervolgens worden ze zonder verdere experimentele handelingen gedood en de organen geïsoleerd voor histologische, structurele, genomische en elektrofysiologische bepalingen. Daarnaast zullen controle, heterozygote en homozygote embryo's en foeten worden geïsoleerd (zie Figuur 2) voor histologische, structurele, genomische en elektrofysiologische bepalingen. De uitkomst van deze screening laat het effect van het gemodificeerde regulatoire DNA of gen zien, en geeft inzicht in de rol van de variant/het gen in hartontwikkeling en ritmestoornissen. In deze lijnen wordt vervolgens in volwassen dieren een hartinfarct geïnduceerd en het regeneratie proces (response van het hart en vorming infarct) op verschillende tijdpunten, maar tot maximaal 3 maanden, na de ingreep bestudeerd.

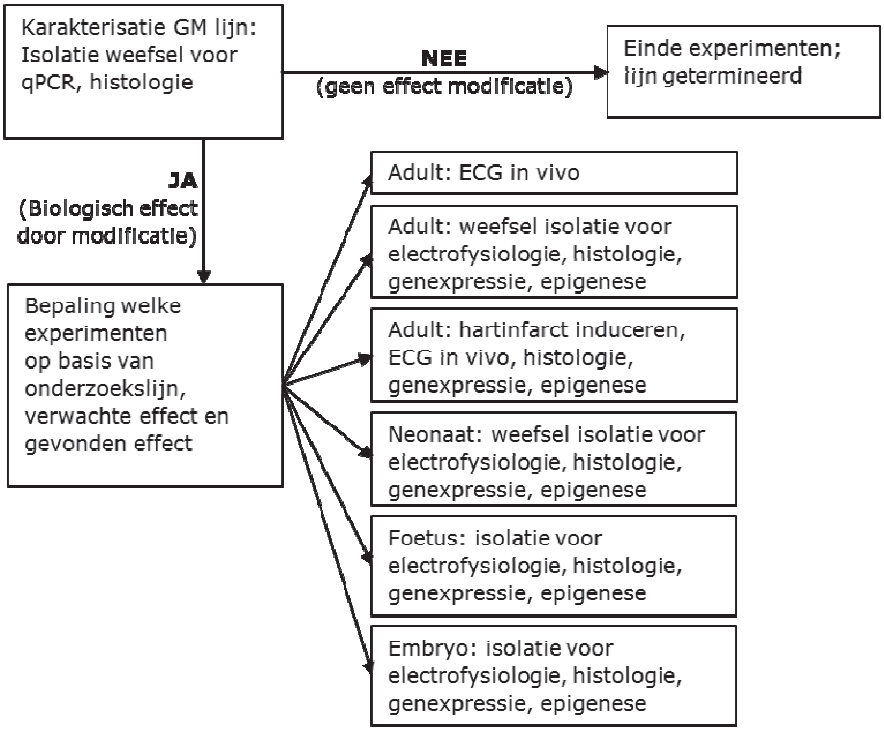
3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij

gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Het doel van dit project is om de functie vast te stellen van genetische elementen (regulatoire elementen, genen) in de ontwikkeling, functie en ziekteverloop van het hart.

Van elke transgene lijn zal eerst van heterozygote gemodificeerde dieren weefsel van interesse worden geïsoleerd, zonder dat er voorafgaand handelingen met de muizen worden uitgevoerd (Figuur 2). Dit weefsel wordt gefixeerd voor histologie en uit dit weefsel wordt RNA geïsoleerd om met qPCR te bepalen welk effect de modificatie heeft op genexpressie. Als de genetische modificatie geen-, of een zeer klein, effect heeft op een van de eigenschappen die hier bepaald worden dan zal de lijn afgevoerd worden.

In transgene lijnen waar een effect op genexpressie is aangetoond, zullen vervolgexperimenten worden gedaan die afhangen van 1) de verwachting van het effect van de modificatie op hartontwikkeling en prikkelgeleiding, en 2) het gevonden effect op genexpressie.




Figuur 2

Bij een verwacht effect op de functie van het geleidingssysteem zullen er ECGs worden uitgevoerd op volwassen hetero- en homozygote muizen. Daarnaast zullen er elektrofysiologische experimenten (optical mapping en patch clamp) experimenten worden uitgevoerd op geïsoleerde harten. Verder zullen embryo's en foeten worden geïsoleerd om de effecten van de modificatie tijdens hartontwikkeling te bestuderen. Deze embryo's en foeten worden onderzocht op anatomie genexpressie en elektrofysiologische.

Bij een verwachte rol van modificaties in boezemfibrilleren zullen *in vivo* ECGs worden afgenomen van hetero- en homozygote dieren. Daarnaast zal weefsel geïsoleerd worden van volwassenen en neonaten voor *ex vivo* ECG, optical mapping, patch clamp experimenten, genexpressiebepaling ([redacted] en epigenetische parameters [redacted]

Bij een verwacht effect van modificaties op de elektrofysiologische functie van de kamers zullen in vivo ECGs worden afgenomen op hetero- en homozygote dieren. Daarnaast zal weefsel geïsoleerd worden van adulten en neonaten voor *ex vivo* ECG, optical mapping, patch clamp experimenten, genexpressiebepaling [redacted] en epigenetische parameters [redacted]

Bij een verwacht effect op hartontwikkeling zal er zowel op embryonaal, foetaal, neonataal als adult niveau gekeken worden naar het effect van de modificatie. Weefsels worden geïsoleerd van dieren na geboorte zonder voorafgaande handeling voor morfologische/histologische etc. analyses, en bepalingen van epigenetische parameters [redacted] Vrouwtjes worden zwanger gemaakt en heterozygote en homozygote embryo's en foeten worden geïsoleerd en gedood, en onderzocht als beschreven voor de weefsels van volwassen dieren.

Bij een verwacht effect op het ziekteverloop zal in volwassen wildtype, heterozygote en homozygote dieren chirurgische een hartinfarct worden geïnduceerd. Op verschillende tijden na de inductie wordt een in vivo ECG gemaakt en weefsels geïsoleerd. Het weefsel wordt gebruikt voor morfologische/histologische analyses, en bepalingen van epigenetische parameters ([redacted] De varianten of mutaties gevonden bij mensen met de ritmestoornissen, hartdefecten en ziekteverloop vertonen overlap. Om de aspecten van de complexe genetische basis van hartafwijkingen, ritmestoornissen en ziekteverloop te modelleren zullen lijnen met verschillende modificaties onderling gekruist worden om de combinatie van genetische modificaties te kunnen analyseren. Van deze samengestelde lijnen wordt opnieuw het ongerief ingeschat gedurende de eerste twee generaties, en bepaald wat de vervolgexperimenten zijn op basis van 1) de verwachting van het effect van de modificatie op hartontwikkeling, prikkelgeleiding, etc. en 2) het gevonden effect op genexpressie.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

In dit project onderzoeken we de rol van regulatoire DNA elementen en kandidaat genen in hartontwikkeling en hartziekte. Iedere nieuw gemaakte of geïmporteerde TG lijn zal een proces doorlopen met verschillende mijlpalen en keuzemomenten zoals weergegeven in Figuur 1 en 2 en als hierboven beschreven.

Het mechanisme van hartontwikkeling hangt nauw samen met dat van de functie van het geleidingssysteem en ritmeregulatie. Daarom hebben de experimenten een duidelijke samenhang; de processen en functies die worden gemeten hebben een directe relaties met elkaar.

Interactie:
De gevonden effecten in de eerste fase expressiebepaling (in de tweede generatie nakomelingen; Figuur 2) hebben consequenties voor het daarna te volgen experimentele traject. In de tweede fase zullen alle lijnen onderzocht worden op structurele afwijkingen, elektrofysiologische afwijkingen en genexpressie afwijkingen. Echter, afhankelijk van de waargenomen effecten van modificatie in de eerste screening en de verwachting, zal de nadruk worden gelegd op structuur bepalingen (aangeboren hartafwijkingen) of electrofysiologische bepalingen (ritmestoornissen). Resultaten van de experimenten in de tweede fase hebben consequenties voor de keuze om dieper te onderzoeken, in een andere richting te onderzoeken of het onderzoek af te ronden.

Mijlpalen:
- Succesvolle generatie founders en daaruit voortkomende lijnen
- Succesvol karakteriseren van de muizenlijn, en besluit tot verder onderzoek of tot terminatie.
-Succesvol vaststellen van het fenotype van heterozygote en homozygote dieren; besluit tot vervolgexperimenten.
- Achterhalen van het werkingsmechanisme van de gemodificeerde genen en elementen.

Keuzemomenten zijn:
- Founders worden geïdentificeerd, overgeschreven op dit protocol en gekruist met een wildtype muis om een lijn te genereren.
- De lijn wordt onderzocht (heterozygote dieren van de 1e en 2e generatie) en gezondheid gemonitord voor besluit fok zonder of met risico op ongerief.
- Op basis van de aangebrachte modificatie wordt van een set kandidaat-genen bepaald of de expressie

is veranderd. Als genexpressie is veranderd, wordt de lijn aangehouden, zo niet dan wordt de lijn getermineerd (Figuur 1).
- Op basis van de resultaten van de experimenten zal besloten of, en welke, vervolgexperimenten nodig zijn.
- Als het ECG een verandering laat zien als gevolg van modificatie, wordt de lijn verder elektrofysiologisch en moleculair onderzocht. Als het ECG geen verandering laat zien maar expressie van genen met een verwachte rol in functie aangedaan is zal de lijn verder onderzocht worden.
- Als een structurele afwijking wordt gevonden in het hart (of ander orgaan) zal de ontwikkeling worden onderzocht en de moleculaire mechanismen.
- Als de expressie is aangedaan van genen met een verwachte rol in regulatie van genexpressie, van groei, van ontwikkeling, zal het effect van de modificatie op regeneratie onderzocht worden.
- Een combinatie van bovenstaande effecten zal leiden tot analyse van functie, structuur, ontwikkeling en regeneratie.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|---|---|
| 1 | ECG, MI, Isolatie van weefsel uit neonaten en adulten |
| 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 | Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval |
| 1.2 | Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | Aangeboren hartafwijkingen, regeneratie, ritmestoornissen, genetische elementen |

## 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)

Variatie in de genetische opmaak beïnvloeden in hoge mate de kans op problemen aan het hart en hoe iemand daarna herstelt. Uit de literatuur blijkt dat mutaties en variaties in het DNA die aangeboren hartafwijkingen en ritmestoornissen veroorzaken, sterk overeenkomen. Ook de ontwikkeling van hart en het herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. Zo kunnen volwassen harten niet goed herstellen na een hartinfarct, maar kinderharten kunnen dat wel. Door de precieze route van hartontwikkeling in een beschadigd hart in kaart te brengen, kan dit leiden tot een therapie om de regeneratie van het hart te verbeteren.

Met dit onderzoek willen we de werking van de genen en regelelementen die

| | | |
|---|---|---|
| | | de hartontwikkeling aansturen bestuderen en de effecten van mutaties en variaties hierin achterhalen. Deze kennis geeft inzicht in de processen van hartontwikkeling, regeneratie en prikkelgeleiding. Het onderzoek resulteert in betere bepaling van het persoonlijk risico op een hartziekte en een betere diagnose. Uiteindelijk leidt dit tot identificatie van genen waarop de behandeling zich moet richten. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | We verwachten dat dit project ons meer leert over de rol die genetische elementen ("regelelementen en genen") spelen in het ontstaan van hartafwijkingen, regeneratie na hartschade en ritmestoornissen. We verwachten nieuwe aangrijpingspunten te vinden voor het schatten van de kans op en ernst van hartafwijkingen en ritmestoornissen, en voor het ontwikkelen van individuele behandelingen om ritmestoornissen te voorkomen of verhelpen en regeneratie van het hart na schade te stimuleren. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Genetisch gemodificeerde muizen. 9.675 in een periode van 5 jaar |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De dieren met een genetische verandering hebben klein risico op ongerief. Bij de dieren wordt een ECG afgenomen, wat leidt tot matig ongerief.<br>Twintig procent van de dieren die een hartinfarct ondergaat loopt het risico op het ontwikkelen van ernstig hartfalen. Indien dit ontwikkelt worden deze dieren vroegtijdig uit de proef genomen om erger ongerief te voorkomen. Na het ondergaan van het hartinfarct zullen de dieren (tijdelijk) individueel gehuisvest worden, voor een beter en sneller herstel na de operatie. Op langere termijn geeft individuele huisvesting stress aan de muizen, aangezien zij van nature in groepsverband leven. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Muizen worden zonder voorafgaande ingreep gedood om weefsels te verzamelen (mild ongerief). Bij de dieren wordt een ECG afgenomen onder anesthesie, wat leidt tot matig ongerief. Dieren die onverwacht risico op ongerief blijken te hebben als gevolg van de genetische verandering (minder dan 10 procent) worden apart gefokt, en gedood als ze daadwerkelijk ongerief hebben. In een deel van de dieren wordt een hartinfarct veroorzaakt, wat leidt tot matig ongerief in 80 procent van de dieren. 20 procent van de dieren met een hartinfarct, ondervindt kortstondig ernstig ongerief, en worden gedood.. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Na afloop worden alle dieren gedood. |

## **4** Drie V's

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | **Vervanging**<br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet | We hebben zoveel mogelijk van het voorwerk uitgevoerd met proefdiervrije methodes, analyses van de werking van genetische elementen in celkweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. De genetische elementen zijn onderdeel van de ingewikkelde processen van hartontwikkeling en regulatie van het hartritme. Hierbij spelen meerdere celtypes, hun interacties en orgaanstructuur een belangrijke rol, waardoor |

| | |
|---|---|
| gebruikt kunnen worden. | het nodig blijft ook dierproeven te doen. |
| 4.2 **Vermindering**<br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | We voeren een statistische berekening uit waarmee we bepalen hoe we met zo min mogelijk dieren de vraagstelling op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden.<br><br>We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen. Voor die nieuwe vragen zijn dan geen nieuwe proefdieren nodig. |
| 4.3 **Verfijning**<br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van het hartritme in de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. We onderzoeken hartfunctie in levende muizen en in geïsoleerde harten. Hiervoor hebben we onlangs geïnvesteerd in een nieuwe elektrische en optische meetopstelling waarmee we hele kleine verschillen in eigenschappen zoals bijv. geleidingssnelheid kunnen vinden. Hierdoor zijn minder muizen nodig om verschillen aan te tonen, wat bijdraagt aan verfijning en aan vermindering. |
| Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | Als onderdeel van de verfijning van de dierproef zetten wij ervaren biotechnici in bij de handelingen aan de proefdieren. Dit vermindert voor een groot deel de stress en het lijden ten gevolge van de handelingen. Als de muizen een kans lopen op pijn door de handelingen wordt pijnbestrijding toegepast. De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze kort aan mogelijke stress blootstaan. Alle dieren in het experiment worden regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. |

## **5** In te vullen door de CCD

| | |
|---|---|
| Publicatie datum | |
| Beoordeling achteraf | |
| Andere opmerkingen | |

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. | 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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 1<br>Type dierproef: Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

In dit type dierproef bestuderen we de rol van genen en regel-elementen in de ontwikkeling, (elektrische) functie en regeneratie van het hart. We onderzoeken genetisch gemodificeerde muizen, reeds bestaand of verkregen via "genome editing" (CRISPR-Cas9). Het betreft knock-outs, knock-ins en gecombineerde transgenen ([redacted]-induceerbare knock-outs (Cre-loxP) of gecombineerde modificaties). We onderzoeken in deze muizen de effecten van de gemodificeerde genen en regel-elementen op de 1) ontwikkelingen van hart we via isolatie van embryo's en foetussen, 2) (elektrische) functie van het hart door het meten van electrische en optische signalen, en 3) regeneratieve response van het hart door chirurgisch induceren van een hartinfarct.
Op diverse niveaus en leeftijden wordt de ontwikkeling, functie en regeneratie van het hart bestudeerd, opgedeeld in de volgende onderdelen:

**1. Gezondheid monitoring en initiële analyse van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen**

Nadat we founders krijgen van de [redacted], zullen deze 2 generaties gefokt worden terwijl de gezondheid gemonitord wordt. Om tijd en dieren te sparen worden jonge muizen (4-8 weken) van de tweede generatie gebruikt voor een initiële analyse van genexpressie in geïsoleerde weefsels om te bepalen of de modificatie in de nieuwe lijn een biologisch effect heeft. Uitkomstparameters: effecten op niveau van genexpressie.

**2. Elektrofysiologische karakterisatie muis**

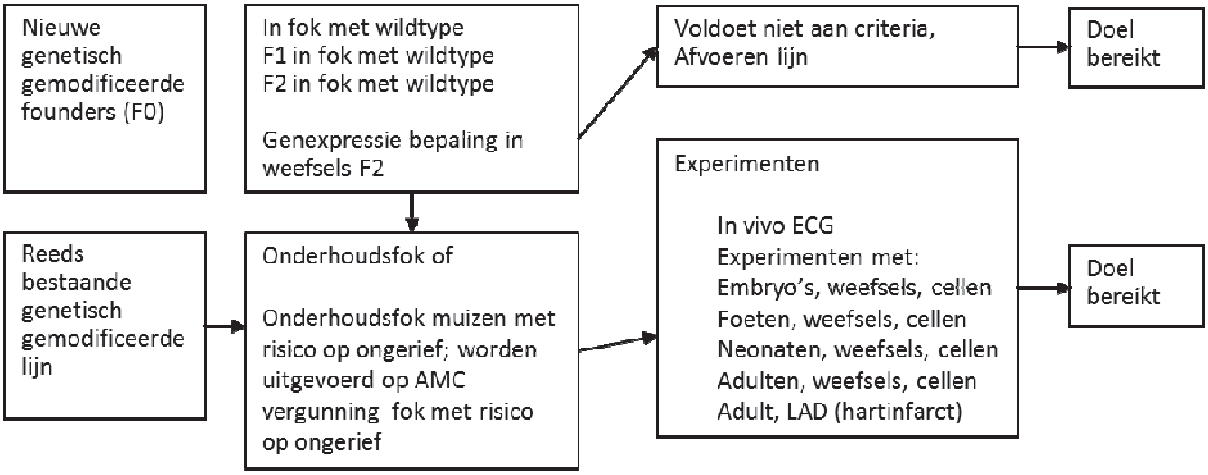
In dit experiment testen we of de genetische modificatie leidt tot elektrofysiologische veranderingen van het hart. We zullen levende transgene muizen onderzoeken onder anaesthesie met behulp van een elektrocardiogram (ECG). uitkomstparameters: QRS-duur, PR-interval, hartritme en QT-tijd.

**3. Karakterisatie ontwikkeling en functie**

In dit experiment worden muizen (embryonale dag 7.5-18.5, neonaat tot en met adult) geofferd zonder voorafgaande handeling om hieruit weefsels te isoleren. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.

**4. Regeneratie na hartinfarct**

In volwassen transgene en controle dieren zal een hartinfarct (MI) worden geïnduceerd. In een deel van de dieren wordt op verschillende momenten na de inductie een stof (eiwitoplossingen zoals [redacted]) ingespoten die regeneratie stimuleert ([redacted]) (veroorzaakt geen additioneel ongerief). Tevens wordt voor, tijdens en na het induceren van het infarct een een ECG afgenomen onder anesthesie. Aan einde van dierproef worden weefsels geïsoleerd voor verdere analyse. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.




Alle experimenten hierboven beschreven staan in het teken van het ophelderen van de functie van geselecteerde genen en regel-elementen in de ontwikkeling, regeneratie en elektrofysiologische functie van het hart, en de bijdrage van modificaties in deze genen en regel-elementen aan aangeboren hartafwijkingen, regeneratie en ritmestoornissen.

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.

**Twee generaties fok en initiële analyse nieuwe genetisch gemodificeerde lijn.**

Handeling: offeren van muis zonder voorafgaande handeling

De founder (F0) wordt gekruist met een wildtype dier. De eerste generatie nakomelingen (F1) wordt gecontroleerd op kiembaan transmissie van de modificatie. Gemodificeerde dieren worden gebruikt voor het genereren tweede generatie (F2). 5 transgene F2 muizen en 5 wildtype nestgenootjes worden geëuthanaseerd om weefsels te isoleren voor genexpressie bepaling (qPCR). 5 dieren worden aangehouden om naar de fokunit over te plaatsen om de lijn aan te houden, tenzij de genexpressie analyse uitwijst dat de modificatie geen biologisch effect heeft. In dat geval wordt de lijn getermineerd. Van alle muizen wordt de gezondheid gemonitord. Bij vaststelling risico ongerief wordt de lijn overgeplaatst op protocol fokken met ongerief risico.

**Het meten van het ECG van levende muizen**.

Handelingen: Afnames van ECGs op verschillende tijdsmomenten.

Aanpak: De muizen worden verdoofd met 4% isofluraan in 1L/min $O_2$ waarna aan alle vier de poten een elektrode zal worden bevestigd. Gedurende vijf minuten zal een ECG worden afgeleid om PQ, QRS, RR en QT intervallen te bepalen. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na het laatste ECG wordt de muis gedood en het hart geïsoleerd en verder geanalyseerd. Het ECG geeft inzicht in de elektrische functie van het hart en is een non-invasieve methode waardoor we eenzelfde muis op

verschillende tijdsmomenten kunnen te bemeten.

**Weefsel isolatie uit embryo's, neonaten en volwassen dieren**
Handelingen: offeren van muis zonder voorafgaande handeling.
Aanpak: voor adulten, offeren van de muis en daarna weefsel isolatie. Het doden van dieren wordt gedaan volgens richtlijn 2010/63/EU (ongerief licht).
Voor neonaten: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt, blijft het koppel instaan en uit dit koppel worden pups geboren. Deze worden op verschillende dagen na de geboorte (neonatale stadia) geanalyseerd. Op de dag van isolatie zullen de pups van de moeder worden weggenomen. Offeren van pups en daarna weefsel isolatie.

Kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt.
Handeling adulten: [redacted] injecties; offeren
Aanpak: Muizen worden voor inductie van de genexpressie behandeld met [redacted] voor max 4 dagen. Intraperitoneale toediening (ongerief licht) of oraal toedienen dmv een gavage naald (ongerief licht) of intragastraal toedienen dmv injectienaald (ongerief licht). Volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [redacted].

**Embryo/foeten isolatie**
Handelingen: muis drachtig laten worden; echo; [redacted] injecties; offeren
Aanpak: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt het koppel uit elkaar gehaald. De plug wordt gezien als embryonaal stadium (E)0.5. Er zullen embryo's en foeten geïsoleerd worden vanaf E7.5 tot en met E18.5. Als er vroege stadia embryo's worden geïsoleerd (tot en met E10.5), zal er eerst een echo gemaakt worden om te kijken of de muis daadwerkelijk drachtig is. Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn. Vanaf E11.5 is het voor de dierverzorgers met het oog zichtbaar of het vrouwtje drachtig is of niet. In het geval van een kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt, zal [redacted] worden toegediend aan de moeder. Na het offeren van de drachtige muis wordt de uterus verwijderd en in ijskoude PBS gedaan. In deze ijskoude PBS worden de embryo's geïsoleerd. Deze zullen worden gefixeerd in 4% PFA of bevroren worden in vloeibare stikstof. Embryo's ouder dan E12.5 worden eerst gedecapiteerd en de borstkas wordt geopend zodat de formaldehyde beter doordringt tot hart en andere organen.

**Inductie hartinfarct**
Handeling: bloedafnames; [redacted] injecties; kransslagaderligatie
Onder algehele anaesthesie en adequate analgesie zal bij de muizen een permanente ligatie van de linker kransslagader worden aangebracht (ongerief matig). De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen voor/tijdens en na de operatie pijnstilling krijgen. Voorafgaand aan de operatie wordt bloed afgenomen voor biochemische/immunologische bepalingen, volgens richtlijn https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling (ongerief licht). Na de operatie worden de muizen individueel gehuisvest om goed te kunnen herstellen. De dieren zullen na de operatie voor een bepaalde periode gevolgd worden. In subgroepen dieren wordt meermaals een stof ingespoten, zoals opgeloste eiwitten [redacted], die een invloed heeft op regeneratie-gerelateerde processen (volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [redacted]., ongerief gering). Na deze periode zal van de dieren een ECG worden afgeleid onder anesthesie waarna het dier wordt geofferd voor weefselisolatie.

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

Power berekeningen, met een power van 0.8 en een alpha van 0,05, worden gebruikt om het minimum aantal benodigde dieren te berekenen dat nodig is om een bestaand verschil statistisch significant waar te nemen, zoals 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/). Om een verschil tussen de gemiddelden van de twee groepen te meten, is het nodig te weten hoe groot dat verschil is ten opzichte van de standaard deviatie in ieder van de groepen. Voor een relatief verschil (experimenteel ten opzichte van controle) is een schatting van de standaard deviatie van deze ratio nodig. Aangezien we op dit moment geen experimentele data hebben mbt de individuele genen, nemen we voor de schatting de grootste bron van variatie, de biologische variatie, waarvan we uit eerdere experimenten weten dat die tussen de 20 en

30% (CV=0.2 -0.3) ligt. Aangezien de biologische variatie voor zowel de controle als de experimentele groep geldt, kan hieruit met doorwerking van fouten de standaard deviatie van de ratio worden berekend (SD-ratio). In onderstaande tabel staat voor een aantal mogelijke relatieve verschillen en een reeks van CVs het minimaal aantal dieren per groep dat nodig is om het verschil aan te tonen als het werkelijk aanwezig is.

| | |
|---|---|
| alpha | 0.05 |
| power | 0.8 |

| | CV (Biologische variatie | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0.1 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 |
| | SD-Ratio | | | | |
| Rel Verschil | 0.14 | 0.28 | 0.35 | 0.42 | 0.57 |
| 1.25 | 5.0 | 20.1 | 31.4 | 45.2 | 80.4 |
| 1.50 | 1.3 | 5.0 | 7.8 | 11.3 | 20.1 |
| 2.00 | 0.3 | 1.3 | 2.0 | 2.8 | 5.0 |
| 2.50 | 0.1 | 0.6 | 0.9 | 1.3 | 2.2 |
| 3.00 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.3 |
| 5.00 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |

Wanneer er experimentele waardes uit pilotexperimenten bekend zijn, zal er met de gegevens powerberekening wordt uitgevoerd met software voor groepsgrootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower). De aantallen uit tabel die in rood zijn aangegeven vinden wij niet acceptabel. Eerder gepubliceerde onderzoeken van onze groep laten zien dat een groepsgrootte tussen 5 en 10 dieren vaak voldoende blijkt om functioneel relevante verschillen aan te [redacted]

**B. De dieren**

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

**Diersoorten:** Muizen, 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.
**Herkomst:** In dit experiment worden muizen gebruikt, welke voortkomen uit eigen fok of zelf gecreëerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9 techniek, of worden verkregen van een commerciële afleveringsbedrijf of van een andere onderzoeksgroep.
**Levensstadia:** Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. De leeftijden lopen van embryonaal tot adult. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen door elkaar heen worden gebruikt.
**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 maximale hoeveelheden dieren aangevraagd:

1. Elektrofysiologische karakterisatie muis: Van 20 dieren per lijn ECGs afnemen; 50 lijnen in 5 jaar: 20 x 50 =1000 ECGs. Deze muizen zullen na het meten van de laatste ECG geofferd worden, waarbij zij dan vallen onder punt 3. Onder dit punt worden dus geen muizen geofferd.
2. Twee generaties fok nieuwe genetisch gemodificeerde lijn: 1 founder, 20 F1 muizen en 30 F2 muizen per lijn. 50 nieuwe lijnen in 5 jaar = max. **2550** muizen.
3. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie volwassen hart: Verwachting: 40 lijnen per 5 jaar (niet alle lijnen uit punt 2 worden volledig onderzocht). Per lijn 30 adulte muizen (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 15 heterozygoten, 15 homozygoten; diverse analyses) = 40 x 35 = **1400**.
4. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie neonatale hart. Per lijn 75 neonaten (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 10 heterozygoten, 10 homozygoten; 3 stadia, diverse analyses). 15

lijnen in 5 jaar: **1125**.
5. Karakterisatie van de prenatale ontwikkeling en functie: Per lijn 24 drachtige muizen, waarvan 40% E14.5 en ouder zal zijn. Gemiddeld aantal embryo's/foeten per nest: 10; 25 lijnen in 5 jaar: 14 moeders+10 moeders +(10 x 10 foeten) x 25 = **3100** muizen.
6. Regeneratie na hartinfarct: maximaal 5 lijnen per jaar. Hierbij wordt in 3 groepen per lijn (wildtypes, enkel transgen/heterozygoot en gecombineerde allelen / homozygoten) een hartinfarct geïnduceerd. Voor een volledige analyse zijn maximaal 60 muizen per lijn nodig = 300 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = **1500** muizen.

De som van de dikgedrukte getallen geeft een totaal van maximaal 9.675 dieren voor de periode van 5 jaar. Deze aantallen zullen alleen gehaald worden als voor elke lijn het maximale aantal analyses wordt uitgevoerd.

**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 zullen zoveel mogelijk van het voorwerk uitvoeren met proefdiervrije methodes; te weten analyses van de werking van genetische elementen in celkweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. In vivo werken de genetische elementen in de context van het uiterst complexe proces van hartontwikkeling en ritmeregulatie. Bij deze processen spelen verschillende celtypes een rol, waarbij hun interacties en de veranderende orgaanstructuur een belangrijke rol spelen. Als gevolg van deze complexiteit is het niet mogelijk dit proces volledig in vitro na te bootsen. Om de normale en/of afwijkende ontwikkeling en functie van het hart te kunnen onderzoeken is een dierproeven noodzakelijk. We achten daarom deze dierexperimenten essentieel voor het bereiken van het onderzoeksdoel.

*Vermindering:*
We voeren een statistische berekening uit waarmee we kunnen inschatten hoe we met zo min mogelijk dieren, toch de vraag op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden. Tevens worden genetische elementen voorafgaand aan een dierproef uitgebreid bioinformatisch, in patiënten materiaal en in in vitro kweeksystemen geanalyseerd.
Door tegelijkertijd met de gezondheidsmonitoring een eerste validatie van de muizenlijn op genexpressie niveaus uit te voeren, kan al in een vroeg stadium bepaald worden of de genetische verandering in de muizenlijn een voldoende groot effect heeft voor het beoogde onderzoek. Mocht dit niet het geval zijn, dan wordt de lijn getermineerd en zullen er dus geen verdere experimenten met deze lijn worden uitgevoerd. Deze stap zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren, maar ook van het aantal muizenlijnen dat in onderhoudsfok staat. Op grond van deze eerste genexpressie analyse zal per lijn bepaald worden welke van de experimenten de beste informatie zullen opleveren over het effect van de modificatie. Met andere woorden, niet alle in deze aanvraag beschreven experimenten zullen op alle te genereren muizenlijnen worden uitgevoerd.
Door zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor deze experimenten worden er minder dieren uit voorraad gedood dan bij het gebruikt van slechts een geslacht.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen, zonder dat hier een nieuwe dierproef voor hoeft te worden ingezet. Meerdere ECGs kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde dier om de technische variatie te verkleinen en eventuele tijdsgebonden processen te volgen.

*Verfijning:*
Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van ritme in de mens ([redacted] We nemen ECGs af van muizen omdat het ECG de voorkeursmethode in de kliniek is om elektrische hartfunctie van patiënten te meten. Dit maakt het mogelijk om de bevinding in de muis te transleren naar de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. Daarnaast worden de analysemethodes zoveel mogelijk verfijnd en hebben we geïnvesteerd in nieuwe ECG apparatuur waarmee we hoogwaardige ECGs kunnen afnemen.
De verdere karakterisering van hartfunctie wordt ex vivo uitgevoerd met behulp van een Langendorff-perfusie-opstelling. Met deze methode is het mogelijk een zeer hoge resolutie in tijd en ruimte te bereiken waardoor kleine maar significante verschillen met een minimaal aantal muizen kunnen worden aangetoond.
Deze meeting en interventies zullen door ervaren analisten worden uitgevoerd, zodat technische mislukkingen tot een minimum worden beperkt.
Wanneer er embryo's of foeten moeten worden geïsoleerd, zal het vrouwtje alleen worden geofferd wanneer zij uiterlijk kenmerken van drachtigheid vertoond. Wanneer wel een zwangerschap wordt verwacht en er geen of onvoldoende uiterlijke kenmerken zijn, dan zal met een echo bepaald worden of het vrouwtje daadwerkelijk drachtig is. Bij weghalen bij moeder van pups tot speenleeftijd (21 dagen) er altijd zorg voor worden gedragen dat er 2 pups bij de moeder achterblijven om stuwing van de moedermelk en borstontsteking te voorkomen.
De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk weer teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze steeds maar kort aan de mogelijke stress door de handelingen blootstaan. Alle dieren in experiment worden heel regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. Tijdens en na de MI operatie wordt pijnstilling gegeven.

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

Door de dieren voor het euthanaseren door middel van cervicale dislocatie te bedwelmen met $CO_2$, wordt pijn en angst voor de dieren tot een minimum beperkt.
In een klein deel van de muizen wordt t[redacted] stof toegediend. Het toedienen wordt gedaan door biotechnici die veel ervaring hebben om het ongerief tot een minimum beperkt.
Bij muizen met een hartinfarct zal goede monitoring helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd. Pijnstilling wordt systemisch en lokaal gegeven tijdens en na operaties.
Alle dieren worden op D1 niveau gehuisvest.

## 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.

Na de hartinfarct (MI) operatie zullen de muizen individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat kooigenoten de hechtingen openknagen wat tot ernstig ongerief leidt. Tevens hebben we in het verleden waargenomen dat wanneer een kooigenoten meer ongerief ondervinden dan een van de andere kooigenoten, de kooigenoot met het minste ongerief dominant gedrag vertoont, wat het ongerief van de andere kooigenoten versterkt. Dit gedrag is sterker bij mannen dan bij vrouwen.
De mannelijke muizen worden maximaal 1 maand individueel gehuisvest, aangezien het samen huisvesten van mannelijke muizen na separatie niet mogelijk is zonder kans op vechten. De vrouwelijke muizen worden maximaal 1 week individueel gehuisvest, zodat de wond optimaal kan genezen. Hierna worden zij weer in groepsverband gehuisvest.

**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.

Om pijn bij embryo's en foeten te voorkomen wordt de uterus met de embryo's/foeten overgebracht naar ijskoude fysiologische zout oplossing. Door de hypothermie zullen de embryo's overlijden en de foeten verdoofd raken. De foeten worden vervolgens gedood door decapitatie.

Wanneer een ECG afgeleid wordt zal het dier verdoofd worden met isofluraan omdat de dieren stil moeten liggen om een betrouwbaar ECG af te kunnen leiden. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na de afname van het laatste ECG wordt het dier gedood voordat het bijkomt uit de narcose, en worden de organen geïsoleerd voor analyse. Door deze handelingen te combineren wordt het ongerief beperkt.

Na de kransslagader ligaties voor de hartinfarct experimenten kunnen de muizen pijn ondervinden. De operaties gebeuren onder algehele verdoving en de muizen worden voor/tijdens en na de operatie behandeld met pijnstilling. De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen na de operatie pijnstilling ontvangen. De dieren zullen tijdens de operatie op een warmtemat worden geplaatst. Daarnaast krijgen de dieren minimaal 3 dagen na de operatie hoogenergetisch natgemaakt voer. De dieren worden minimaal 1 week dagelijks gemonitord, en zodra de situatie het toelaat twee keer per week gemonitord.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Echo om jonge zwangerschap vast te stellen: Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn (ongerief: licht).

Toediening [redacted].

Fok met risico op ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij injectie t[redacted]: irritatie van plaats van injectie.

Bij fok met ongerief: het eventuele ongerief als gevolg van de genetische modificatie zal zich waarschijnlijk uiten in hartfalen.

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

De toedieningen worden uitgevoerd door ervaren biotechnici.

Als het risico op ongerief groot is (meer dan een kwart van de dieren heeft ernstig ongerief) zal de lijn getermineerd 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.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Algemeen: Bij het bereiken van humane eindpunten, zoals het ontwikkelen van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, afwezige voedselinname, of diarree – over een periode van 2-3 dagen, het aantreffen van wonden, of meer dan 10% gewichtsverlies in een week.

Hartinfarct operatie: Tijdens operatie: veel bloedverlies. De eerste week postoperatief: ernstige infectie van de wond, 15% gewichtsverlies ten opzichte van gewicht voor operatie. Uitingen van acuut hartfalen: verminderde activiteit, slecht poetsen, extreme kortademigheid, opgebolde rug, als er de dieren weer op uitgangsgewicht gekomen zijn, 8% gewichtsverlies in 1 dag of meer dan 10% in 2 dagen.

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

Minder dan 1% voor alle niet invasieve experimenten en voor de muizen die een hartinfarct ondergaan verwachten we dat dit 20% is ([redacted]

## 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.

De voor de meeste muizen die op dit protocol worden gebruikt, wordt het ongerief geclassificeerd als licht omdat er bij deze muizen geen handeling worden uitgevoerd voor het doden (max. 8175 muizen).
Wanneer er tijdens het leven van een muis een ECG afgenomen wordt, dan wordt het ongerief geclassificeerd als matig als gevolg van het bijkomen uit de narcose (max. 1000 muizen).
Voor een muis waaraan [redacted] wordt toegediend, wordt het ongerief geclassificeerd als licht (afhankelijk van gebruik aantal conditionele lijnen (max 1000 muizen) + 500 muizen na infarct).
Voor muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1200), wat bij het ontwikkelen van hartfalen in 20% van de geopereerde muizen kortstondig matig kan zijn (max. 300).

## 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 organen geïsoleerd 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

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 — Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart

3. Titel van de NTS — Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval

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 — 27 juli 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 identificeren van genetische elementen (regulatoire elementen en genen) die nodig zijn voor de ontwikkeling en voor de elektrische functie van het hart, het achterhalen van het onderliggende mechanisme van hun functie, en het onderzoeken van hun functie in het herstel (regeneratieve respons) na een hart infarct].
De aanvragers richten zich op 5 verschillende gebieden:
1. de functie van het geleidingssysteem.

2. de functie van het atrium en boezemfibrillatie.
3. gevoeligheid voor ritmestoornissen van de kamers, met name de rechterkamer uitstroom, waar bij de mens veel ritmestoornissen ontstaan.
4. het ontstaan van aangeboren hartafwijkingen.
5. Regeneratie na hartschade.

De subdoelen zijn niet tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van onderzoeksgroep met het bestuderen van genetische elementen in hartziekten. De personele bezetting en de financiële situatie voorzien verder in de behoeftes aangaande het voorgestelde onderzoek.

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 genetische elementen in afwijkingen in het functioneren van het hart.

*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 inzicht in de rol van genetische elementen in het functioneren van het hart) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het vinden van mechanismen en genen die door menselijk handelen kunnen worden beïnvloed ("druggable") en zo kunnen leiden tot verbeterde behandelingen. Ondanks dat de toepassing van deze kennis in een behandelmethode in de toekomst ligt, 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 project, zijn de proefdieren, de onderzoekers en in mindere mate patiënten met (aangeboren of verkregen) hart- en vaatziekten. Een deel van de muizen wordt door dit onderzoek geschaad omdat ze pijn en stress ondergaan door een operatie, het individueel huisvesten tijdens de herstelperiode of het ondergaan van een ECG meting onder verdoving. Het grootste gedeelte wordt gedood zonder voorafgaande behandeling. 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 hun nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op lange termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van aangeboren en verkregen hartziekten.

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.

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. Na een genetische modificatie zal de fok voor twee generaties gevolgd worden op het ontwikkelen van ongerief. In een volwassen muis zal een ECG gemaakt worden om veranderingen in de elektrofysiologie te onderzoeken. In embryo's, neonaten en volwassen dieren worden structurele, functionele of moleculaire veranderingen in weefsels en organen bepaald. In volwassen dieren zal een hartinfarct geïnduceerd worden door middel van een operatie om de regeneratie te bestuderen. In dit experiment wordt het effect van toediening van herstel stimulerende stoffen bestudeerd. De DEC is van mening dat deze onderzoeksstrategie kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

   *Welzijn dieren*

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

   ☐ 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. Dieren die een hartinfarct operatie ondergaan worden individueel gehuisvest om het openknagen van hechtingen door kooigenoten te voorkomen. Bij vrouwelijke dieren duurt dit herstel een week. Mannelijke dieren worden na het herstel niet meer sociaal gehuisvest omdat er een te groot risico op vechten is. Voor de mannelijke dieren duurt de individuele huisvesting (maximaal) een maand.

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 cumulatieve ongerief is ingeschat op licht voor muizen die zonder voorafgaande behandeling gedood zullen worden en maximaal matig voor muizen die herhaald een ECG (onder verdoving) en/of een hartinfarct operatie zullen ondergaan. Dieren die acuut hartfalen ontwikkelen (wat ernstig ongerief veroorzaakt) na het induceren van het hartinfarct zullen na constatering van symptomen die hierop wijzen, direct uit de proef genomen worden. De inschatting van matig ongerief is daarom voor deze groep dieren juist ingeschat.

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 aangetast doordat er genetische modificaties plaatsvinden. Er wordt niet verwacht dat hierdoor sprake zal zijn van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen. Na het induceren van het hartinfarct kan het dier wel stress en pijn ondervinden waardoor het natuurlijk gedrag verstoord wordt.

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 om onverwacht ongerief te voorkomen. Dieren die tekenen vertonen van algemeen onwelzijn of geen exploratief gedrag meer hebben, zullen vroegtijdig uit de proef genomen worden. Voor de dieren die een hartinfarct operatie ondergaan worden deze gedefinieerd als veel bloedverlies tijdens de operatie en na de operatie: infectie van de wond, >15% gewichtsverlies en uitingen van acuut hartfalen. Het percentage dat in de groep met niet-invasieve experimenten een HEP zal bereiken wordt geschat op <1% en voor de overige muizen <20%. De DEC beoordeelt deze inschatting realistisch, gezien de ervaring van de aanvrager met dit type onderzoek.

*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 genetische elementen in de ontwikkeling van het hart en de regulatie van het ritme niet in een proefdiervrij alternatief bestudeerd kan worden omdat het een zeer complexe interactie van verschillende celtypes betreft. De aanvragers geven aan zoveel mogelijk voorwerk met proefdiervrije methodes te verrichten, zoals de werking van genetische elementen in specifieke celtypes, genetische analyse van patiëntmateriaal, en bioinformatische analyses om de functie van de genetische elementen in te schatten. Gezien de vraagstellingen van dit onderzoek 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 uitkomstparameters. De ECGs en de karakterisatie van het hart worden in dezelfde dieren verricht. Naast de vermindering van proefdieren, is er ook sprake van verfijning (in de zin van de meest geschikte methode) omdat uitkomstparameters geanalyseerd kunnen worden op associaties.

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 muis een goed model is voor de vorming van het hart en de regulatie van het ritme in de mens en de onderzoeksgroep geavanceerde apparatuur tot zijn beschikking heeft om de ECG zo goed mogelijk te kunnen verrichten;
2) de rattenmoeders alleen gedood worden voor de isolatie van embryo's of foeten na controle (echo) op drachtigheid en niet alleen op basis van een aanname van drachtigheid;
3) de onderzoekers over voldoende kennis en kunde bezitten om de proeven zo optimaal uit te voeren.
4) er gebruik gemaakt wordt van pijnstilling tijdens en na de operatie.
Daarnaast borgen de HEPs (symptomen van onwelzijn of ontwikkelen van acuut hartfalen) dat de dieren beschermd zullen worden tegen het ondergaan van onverwacht of ernstiger ongerief dan ingeschat is in deze aanvraag.

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 het hart.

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 genetische elementen spelen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart, het gebruik van maximaal 9675 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 project dat gericht is op het onderzoeken van de rol van genetische elementen op de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit patiënten met een aangeboren of verkregen hartaandoening. Deze kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan

een betere diagnose van en/of een betere therapie voor deze hartaandoeningen.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood zullen worden in het kader van het onderzoek of doordat ze een ECG of een hartinfarct operatie zullen ondergaan. 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 dat zij mogelijk patenten op hun 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 hartaandoeningen en een verbetering in de diagnose. Dit valt echter (ver) buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel maximaal 9675 muizen gebruikt zullen worden voor dit onderzoek, waarvan de meeste zonder voorafgaande behandeling gedood zullen worden(n=7175), een gedeelte van de muizen matig ongerief zullen ondergaan doordat ze een hartinfarct operatie (n=1500) of een ECG (n=1000) zullen 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. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de rol van genetische elementen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart en in de onderliggende mechanismen. De verwachting is dat de inzichten uit dit onderzoek bij kunnen dragen aan een betere diagnose of behandeling van hartaandoeningen. 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 genetische elementen in de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het licht tot matige ongerief en het gebruik van maximaal 9675 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)*.

## Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol die genetische elementen spelen in de ontwikkeling, regeneratie (na een hartaanval) en de functie van het hart, het gebruik van maximaal 9675 muizen en het lichte (n=7175) tot matige ongerief (n=1500 hartinfarct en n=1000 voor herhaalde ECG analyses) 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. Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het grootste

gedeelte van de muizen zullen gedood worden zonder voorafgaande behandeling (naast het genetisch manipuleren). Een gedeelte van de muizen (maximaal 1500) zullen een hartinfarct operatie ondergaan. Analyses met betrekking tot de elektrofysiologie, functionele/structurele/moleculaire karakterisatie, prenatale ontwikkeling en de regeneratie na hartinfarct zullen gebruikt worden om deze doelstellingen te behalen. De aanvrager heeft goed onderbouwd dat er geen proefdiervrij alternatief is voor het beantwoorden van de gestelde vraagstellingen. Het onderzoeken van genetische elementen in de ontwikkeling van het hart en de regulatie van het ritme kunnen niet in een proefdiervrij alternatief bestudeerd worden omdat het een zeer complexe interactie van verschillende celtypes betreft. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar. Het Go/No Go moment betreft vooral de selectie van de genetisch gemodificeerde lijn om de verschillende analyses in te verrichten. De lijn moet de juiste genexpressie hebben. Afhankelijk van het verwachte effect van het gemodificeerde gen wordt daarbij de passende analyse verricht. De genetisch gemodificeerde muizen waarin een ECG verricht wordt zullen ook gebruikt worden voor een functionele/structurele/moleculaire karakterisatie. Dit geeft de mogelijkheid om de associatie tussen verschillende uitkomstparameters te onderzoeken en draagt bij aan zowel verfijning van de strategie als vermindering van proefdieren. De DEC heeft in de afweging meegenomen dat naast de 9675 proefdieren in deze aanvraag, deze onderzoeksstrategie waarbij genetisch gemanipuleerde muizenlijnen gegenereerd zullen worden, een aanzienlijk aantal surplus muizen zal opleveren (muizen met een ongeschikte genexpressie). Deze dieren worden niet als proefdier gerekend maar zijn wel meegewogen in het beantwoorden van de centrale morele vraag.
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 de operatie om het hartinfarct te induceren geoptimaliseerd is en met pijnstilling uitgevoerd zullen worden. Daarnaast zijn de HEPs duidelijk geformuleerd die de dieren beschermen tegen het ontwikkelen van onverwacht of ernstiger ongerief dan vooraf ingeschat is.
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

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
AVD1180020172348

**Bijlagen**
2

Datum 25 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2017. Het gaat om uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020172348. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

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

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

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

**Datum:**
25 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**
25 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

## Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Datum:**
25 augustus 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | [redacted] |
| Afdeling: | [redacted] |
| Telefoonnummer: | 0[redacted] |
| E-mailadres: | [redacted] |

**Over uw aanvraag**

| | |
|---|---|
| Wat voor aanvraag doet u? | [x] Nieuwe aanvraag<br>[ ] Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn<br>[ ] 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: | Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart |
| Titel niet-technische samenvatting: | Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval |
| Naam DEC: | DEC AMC |
| Postadres DEC: | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres DEC: | [redacted] |

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

| | |
|---|---|
| Naam: | [redacted] |
| Functie: | [redacted] |
| Plaats: | Amsterdam |
| Datum: | 25 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
AVD1180020172348

**Bijlagen**
2

Datum 25 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**
Factuurdatum: 25 augustus 2017
Vervaldatum: 24 september 2017
Factuurnummer: 172348
Ordernummer: Kostenplaatsnummer [redacted]

| **Omschrijving** | **Bedrag** |
|---|---|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD1180020172348 | € 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

7.

> 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
AVD1180020172348

Datum 12 september 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

**Onduidelijkheden**
Kunt u zowel in de NTS als in de Bijlage Dierproeven het ongerief van de dieren helderder weergeven? Voor de NTS betreft dit de handelingen aan de dieren en de ongeriefsinschatting (3.4 en 3.5). Voor de Bijlage Dierproeven betreft dit het antwoord van 2K.
Kunt u daarnaast in de NTS aangeven dat de dieren gedood worden in plaats van 'uit de proef genomen'?

**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.

**Datum:**
12 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

**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: AVD1180020172348

**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:**
12 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

## 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

8.

Aanpassingen in CCD aanvraag AVD1180020172348 dd.13-09-2017

[redacted]

Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart

**NTS:**

*Punt 3.4:*

De volgende tekst is toegevoegd:

“De dieren met een genetische verandering hebben een klein risico op ongerief. Aangezien de humane eindpunten in acht worden genomen zal in het incidentele geval het ongerief maximaal matig zijn”

“Een deel van de dieren zal intra peritoneale injectie krijgen, dit geeft licht ongerief.”

“Voor de dieren die een hartinfarct krijgen is het ongerief matig.”

Aan het punt ontwikkeling van hartfalen is het volgende toegevoegd: “Hierbij worden de humane eindpunten in acht genomen, waardoor het ongerief geclassificeerd wordt als matig.”

Daarnaast is “vroegtijdig uit proef genomen” veranderd in “vroegtijdig gedood”.

Aan het punt van individueel huisvesten is het volgende toegevoegd: “Dit geeft matig ongerief.”

*Punt 3.5:*

Aan het punt doden zonder voorafgaande ingreep is toegevoegd: “, wat leidt tot licht ongerief.”

Aan het punt ongerief door genetische verandering is toegevoegd: “Verwacht wordt dat het ongerief hierbij maximaal matig zal zijn.”

Het punt betreffende hartinfarct is aangepast tot de volgende tekst: “In een deel van de dieren wordt een hartinfarct veroorzaakt, wat leidt tot matig ongerief. In 20 procent van de dieren met een hartinfarct, kan ernstig hartfalen ontstaan. Bij constatering van het ontwikkelen van hartfalen zullen de humane eindpunten in acht worden genomen en worden deze dieren gedood waardoor het ongerief maximaal matig zal zijn.”

**BIJLAGE:**

*Punt 2K:*

Het punt betreffende hartinfarct is aangepast tot de volgende tekst:

“De muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1200).

20% van de geopereerde muizen (max. 300) kunnen hartfalen ontwikkelen. Dit valt onder de humane eindpunten en deze muizen zullen bij constatering direct gedood worden. Door het uitvoeren van de humane eindpunten blijft het ongerief als matig geclassificeerd.”

Centrale Commissie Dierproeven

9.

# 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 | Hartafwijkingen, ritmestoornissen en herstel na hartaanval |
| 1.2 | Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | Aangeboren hartafwijkingen, regeneratie, ritmestoornissen, genetische elementen |

## 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)

Variatie in de genetische opmaak beïnvloeden in hoge mate de kans op problemen aan het hart en hoe iemand daarna herstelt. Uit de literatuur blijkt dat mutaties en variaties in het DNA die aangeboren hartafwijkingen en ritmestoornissen veroorzaken, sterk overeenkomen. Ook de ontwikkeling van hart en het herstel na een hartaanval liggen in elkaars verlengde. Zo kunnen volwassen harten niet goed herstellen na een hartinfarct, maar kinderharten kunnen dat wel. Door de precieze route van hartontwikkeling in een beschadigd hart in kaart te brengen, kan dit leiden tot een therapie om de regeneratie van het hart te verbeteren.

Met dit onderzoek willen we de werking van de genen en regelelementen die de hartontwikkeling aansturen bestuderen en de effecten van mutaties en variaties hierin achterhalen. Deze kennis geeft inzicht in de processen van hartontwikkeling, regeneratie en prikkelgeleiding. Het onderzoek resulteert in

| | | |
|---|---|---|
| | | betere bepaling van het persoonlijk risico op een hartziekte en een betere diagnose. Uiteindelijk leidt dit tot identificatie van genen waarop de behandeling zich moet richten. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | We verwachten dat dit project ons meer leert over de rol die genetische elementen ("regelelementen en genen") spelen in het ontstaan van hartafwijkingen, regeneratie na hartschade en ritmestoornissen. We verwachten nieuwe aangrijpingspunten te vinden voor het schatten van de kans op en ernst van hartafwijkingen en ritmestoornissen, en voor het ontwikkelen van individuele behandelingen om ritmestoornissen te voorkomen of verhelpen en regeneratie van het hart na schade te stimuleren. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Genetisch gemodificeerde muizen. 9.675 in een periode van 5 jaar |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De dieren met een genetische verandering hebben een klein risico op ongerief. Aangezien de humane eindpunten in acht worden genomen zal in het incidentele geval het ongerief maximaal matig zijn<br>Bij de dieren wordt een ECG afgenomen, wat leidt tot matig ongerief.<br>Een deel van de dieren zal intra-peritoneale injectie krijgen, dit geeft licht ongerief.<br>Voor de dieren die een hartinfarct krijgen is het ongerief matig. Twintig procent van de dieren die een hartinfarct ondergaat loopt het risico op het ontwikkelen van ernstig hartfalen. Indien dit ontwikkelt worden deze dieren **vroegtijdig** gedood [redacted] om erger ongerief te voorkomen. Hierbij worden de humane eindpunten in acht genomen, waardoor het ongerief geclassificeerd wordt als matig.<br>Na het ondergaan van het hartinfarct zullen de dieren (tijdelijk) individueel gehuisvest worden, voor een beter en sneller herstel na de operatie. Op langere termijn geeft individuele huisvesting stress aan de muizen, aangezien zij van nature in groepsverband leven. Dit geeft matig ongerief. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Muizen worden zonder voorafgaande ingreep gedood om weefsels te verzamelen, wat leidt tot licht ([redacted] ongerief).<br>Bij de dieren wordt een ECG afgenomen onder anesthesie, wat leidt tot matig ongerief.<br>Dieren die onverwacht risico op ongerief blijken te hebben als gevolg van de genetische verandering (minder dan 10 procent) worden apart gefokt, en gedood als ze daadwerkelijk ongerief hebben. Verwacht wordt dat het ongerief hierbij maximaal matig zal zijn.<br>In een deel van de dieren wordt een hartinfarct veroorzaakt, wat leidt tot matig ongerief [redacted]. In 20 procent van de dieren met een hartinfarct, kan hartfalen ontstaan. Bij constatering van het ontwikkelen van hartfalen zullen de humane eindpunten in acht worden genomen en worden deze [redacted] gedood waardoor het ongerief maximaal matig zal zijn. |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | Na afloop worden alle dieren gedood. |

## 4 Drie V's

| | | |
|---|---|---|
| 4.1 | **Vervanging**<br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | We hebben zoveel mogelijk van het voorwerk uitgevoerd met proefdiervrije methodes, analyses van de werking van genetische elementen in celkweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. De genetische elementen zijn onderdeel van de ingewikkelde processen van hartontwikkeling en regulatie van het hartritme. Hierbij spelen meerdere celtypes, hun interacties en orgaanstructuur een belangrijke rol, waardoor het nodig blijft ook dierproeven te doen. |
| 4.2 | **Vermindering**<br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. | We voeren een statistische berekening uit waarmee we bepalen hoe we met zo min mogelijk dieren de vraagstelling op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden.<br><br>We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen. Voor die nieuwe vragen zijn dan geen nieuwe proefdieren nodig. |
| 4.3 | **Verfijning**<br>Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van het hartritme in de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. We onderzoeken hartfunctie in levende muizen en in geïsoleerde harten. Hiervoor hebben we onlangs geïnvesteerd in een nieuwe elektrische en optische meetopstelling waarmee we hele kleine verschillen in eigenschappen zoals bijv. geleidingssnelheid kunnen vinden. Hierdoor zijn minder muizen nodig om verschillen aan te tonen, wat bijdraagt aan verfijning en aan vermindering. |
| | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. | Als onderdeel van de verfijning van de dierproef zetten wij ervaren biotechnici in bij de handelingen aan de proefdieren. Dit vermindert voor een groot deel de stress en het lijden ten gevolge van de handelingen.<br>Als de muizen een kans lopen op pijn door de handelingen wordt pijnbestrijding toegepast. De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze kort aan mogelijke stress blootstaan. Alle dieren in het experiment worden regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. |

## **5** In te vullen door de CCD

| | |
|---|---|
| Publicatie datum | |
| Beoordeling achteraf | |
| Andere opmerkingen | |

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. | 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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 1<br>Type dierproef: Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

In dit type dierproef bestuderen we de rol van genen en regel-elementen in de ontwikkeling, (elektrische) functie en regeneratie van het hart. We onderzoeken genetisch gemodificeerde muizen, reeds bestaand of verkregen via "genome editing" (CRISPR-Cas9). Het betreft knock-outs, knock-ins en gecombineerde transgenen ([redacted]-induceerbare knock-outs (Cre-loxP) of gecombineerde modificaties). We onderzoeken in deze muizen de effecten van de gemodificeerde genen en regel-elementen op de 1) ontwikkelingen van hart we via isolatie van embryo's en foetussen, 2) (elektrische) functie van het hart door het meten van electrische en optische signalen, en 3) regeneratieve response van het hart door chirurgisch induceren van een hartinfarct.
Op diverse niveaus en leeftijden wordt de ontwikkeling, functie en regeneratie van het hart bestudeerd, opgedeeld in de volgende onderdelen:

**1. Gezondheid monitoring en initiële analyse van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen**

Nadat we founders krijgen van de [redacted], zullen deze 2 generaties gefokt worden terwijl de gezondheid gemonitord wordt. Om tijd en dieren te sparen worden jonge muizen (4-8 weken) van de tweede generatie gebruikt voor een initiële analyse van genexpressie in geïsoleerde weefsels om te bepalen of de modificatie in de nieuwe lijn een biologisch effect heeft. Uitkomstparameters: effecten op niveau van genexpressie.

**2. Elektrofysiologische karakterisatie muis**

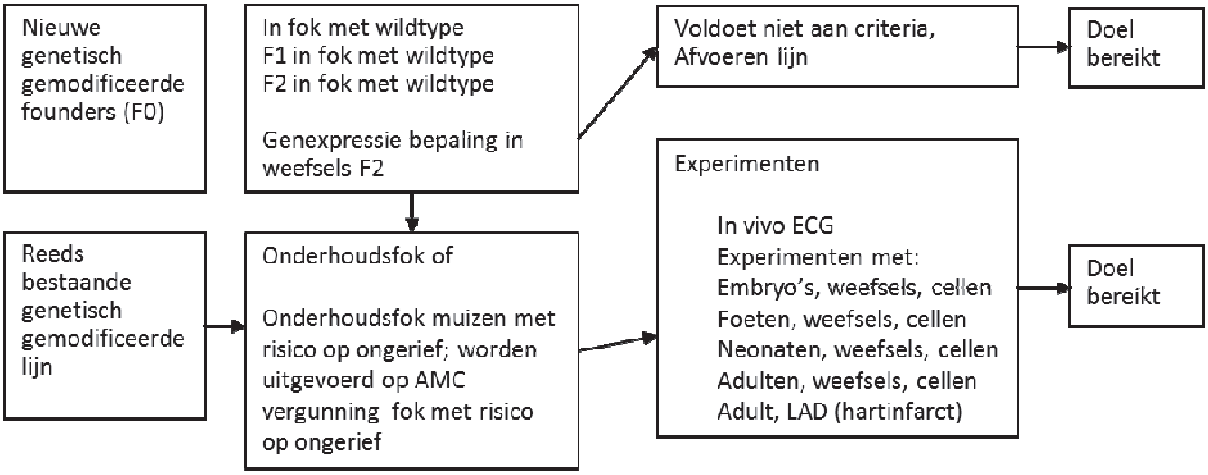
In dit experiment testen we of de genetische modificatie leidt tot elektrofysiologische veranderingen van het hart. We zullen levende transgene muizen onderzoeken onder anaesthesie met behulp van een elektrocardiogram (ECG). uitkomstparameters: QRS-duur, PR-interval, hartritme en QT-tijd.

**3. Karakterisatie ontwikkeling en functie**

In dit experiment worden muizen (embryonale dag 7.5-18.5, neonaat tot en met adult) geofferd zonder voorafgaande handeling om hieruit weefsels te isoleren. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.

**4. Regeneratie na hartinfarct**

In volwassen transgene en controle dieren zal een hartinfarct (MI) worden geïnduceerd. In een deel van de dieren wordt op verschillende momenten na de inductie een stof (eiwitoplossingen zoals [redacted]) ingespoten die regeneratie stimuleert ([redacted]) (veroorzaakt geen additioneel ongerief). Tevens wordt voor, tijdens en na het induceren van het infarct een een ECG afgenomen onder anesthesie. Aan einde van dierproef worden weefsels geïsoleerd voor verdere analyse. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.




Alle experimenten hierboven beschreven staan in het teken van het ophelderen van de functie van geselecteerde genen en regel-elementen in de ontwikkeling, regeneratie en elektrofysiologische functie van het hart, en de bijdrage van modificaties in deze genen en regel-elementen aan aangeboren hartafwijkingen, regeneratie en ritmestoornissen.

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.

**Twee generaties fok en initiële analyse nieuwe genetisch gemodificeerde lijn.**

Handeling: offeren van muis zonder voorafgaande handeling

De founder (F0) wordt gekruist met een wildtype dier. De eerste generatie nakomelingen (F1) wordt gecontroleerd op kiembaan transmissie van de modificatie. Gemodificeerde dieren worden gebruikt voor het genereren tweede generatie (F2). 5 transgene F2 muizen en 5 wildtype nestgenootjes worden geëuthanaseerd om weefsels te isoleren voor genexpressie bepaling (qPCR). 5 dieren worden aangehouden om naar de fokunit over te plaatsen om de lijn aan te houden, tenzij de genexpressie analyse uitwijst dat de modificatie geen biologisch effect heeft. In dat geval wordt de lijn getermineerd. Van alle muizen wordt de gezondheid gemonitord. Bij vaststelling risico ongerief wordt de lijn overgeplaatst op protocol fokken met ongerief risico.

**Het meten van het ECG van levende muizen**.

Handelingen: Afnames van ECGs op verschillende tijdsmomenten.

Aanpak: De muizen worden verdoofd met 4% isofluraan in 1L/min $O_2$ waarna aan alle vier de poten een elektrode zal worden bevestigd. Gedurende vijf minuten zal een ECG worden afgeleid om PQ, QRS, RR en QT intervallen te bepalen. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na het laatste ECG wordt de muis gedood en het hart geïsoleerd en verder geanalyseerd. Het ECG geeft inzicht in de elektrische functie van het hart en is een non-invasieve methode waardoor we eenzelfde muis op

verschillende tijdsmomenten kunnen te bemeten.

**Weefsel isolatie uit embryo's, neonaten en volwassen dieren**
Handelingen: offeren van muis zonder voorafgaande handeling.
Aanpak: voor adulten, offeren van de muis en daarna weefsel isolatie. Het doden van dieren wordt gedaan volgens richtlijn 2010/63/EU (ongerief licht).
Voor neonaten: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt, blijft het koppel instaan en uit dit koppel worden pups geboren. Deze worden op verschillende dagen na de geboorte (neonatale stadia) geanalyseerd. Op de dag van isolatie zullen de pups van de moeder worden weggenomen. Offeren van pups en daarna weefsel isolatie.

Kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt.
Handeling adulten: [redacted] injecties; offeren
Aanpak: Muizen worden voor inductie van de genexpressie behandeld met [redacted] voor max 4 dagen. Intraperitoneale toediening (ongerief licht) of oraal toedienen dmv een gavage naald (ongerief licht) of intragastraal toedienen dmv injectienaald (ongerief licht). Volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn Diehl et al 2001.

**Embryo/foeten isolatie**
Handelingen: muis drachtig laten worden; echo; [redacted] injecties; offeren
Aanpak: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt het koppel uit elkaar gehaald. De plug wordt gezien als embryonaal stadium (E)0.5. Er zullen embryo's en foeten geïsoleerd worden vanaf E7.5 tot en met E18.5. Als er vroege stadia embryo's worden geïsoleerd (tot en met E10.5), zal er eerst een echo gemaakt worden om te kijken of de muis daadwerkelijk drachtig is. Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn. Vanaf E11.5 is het voor de dierverzorgers met het oog zichtbaar of het vrouwtje drachtig is of niet. In het geval van een kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt, zal [redacted] worden toegediend aan de moeder. Na het offeren van de drachtige muis wordt de uterus verwijderd en in ijskoude PBS gedaan. In deze ijskoude PBS worden de embryo's geïsoleerd. Deze zullen worden gefixeerd in 4% PFA of bevroren worden in vloeibare stikstof. Embryo's ouder dan E12.5 worden eerst gedecapiteerd en de borstkas wordt geopend zodat de formaldehyde beter doordringt tot hart en andere organen.

**Inductie hartinfarct**
Handeling: bloedafnames; [redacted] injecties; kransslagaderligatie
Onder algehele anaesthesie en adequate analgesie zal bij de muizen een permanente ligatie van de linker kransslagader worden aangebracht (ongerief matig). De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen voor/tijdens en na de operatie pijnstilling krijgen. Voorafgaand aan de operatie wordt bloed afgenomen voor biochemische/immunologische bepalingen, volgens richtlijn https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling (ongerief licht). Na de operatie worden de muizen individueel gehuisvest om goed te kunnen herstellen. De dieren zullen na de operatie voor een bepaalde periode gevolgd worden. In subgroepen dieren wordt meermaals een stof ingespoten, zoals opgeloste eiwitten [redacted], die een invloed heeft op regeneratie-gerelateerde processen (volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [redacted]., ongerief gering). Na deze periode zal van de dieren een ECG worden afgeleid onder anesthesie waarna het dier wordt geofferd voor weefselisolatie.

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

Power berekeningen, met een power van 0.8 en een alpha van 0,05, worden gebruikt om het minimum aantal benodigde dieren te berekenen dat nodig is om een bestaand verschil statistisch significant waar te nemen, zoals 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/). Om een verschil tussen de gemiddelden van de twee groepen te meten, is het nodig te weten hoe groot dat verschil is ten opzichte van de standaard deviatie in ieder van de groepen. Voor een relatief verschil (experimenteel ten opzichte van controle) is een schatting van de standaard deviatie van deze ratio nodig. Aangezien we op dit moment geen experimentele data hebben mbt de individuele genen, nemen we voor de schatting de grootste bron van variatie, de biologische variatie, waarvan we uit eerdere experimenten weten dat die tussen de 20 en

30% (CV=0.2 -0.3) ligt. Aangezien de biologische variatie voor zowel de controle als de experimentele groep geldt, kan hieruit met doorwerking van fouten de standaard deviatie van de ratio worden berekend (SD-ratio). In onderstaande tabel staat voor een aantal mogelijke relatieve verschillen en een reeks van CVs het minimaal aantal dieren per groep dat nodig is om het verschil aan te tonen als het werkelijk aanwezig is.

| | |
|---|---|
| alpha | 0.05 |
| power | 0.8 |

| | CV (Biologische variatie | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0.1 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 |
| | SD-Ratio | | | | |
| Rel Verschil | 0.14 | 0.28 | 0.35 | 0.42 | 0.57 |
| 1.25 | 5.0 | 20.1 | 31.4 | 45.2 | 80.4 |
| 1.50 | 1.3 | 5.0 | 7.8 | 11.3 | 20.1 |
| 2.00 | 0.3 | 1.3 | 2.0 | 2.8 | 5.0 |
| 2.50 | 0.1 | 0.6 | 0.9 | 1.3 | 2.2 |
| 3.00 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.3 |
| 5.00 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |

Wanneer er experimentele waardes uit pilotexperimenten bekend zijn, zal er met de gegevens powerberekening wordt uitgevoerd met software voor groepsgrootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower). De aantallen uit tabel die in rood zijn aangegeven vinden wij niet acceptabel. Eerder gepubliceerde onderzoeken van onze groep laten zien dat een groepsgrootte tussen 5 en 10 dieren vaak voldoende blijkt om functioneel relevante verschillen aan te tonen.([redacted]

[redacted]

**B. De dieren**

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

**Diersoorten:** Muizen, 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.
**Herkomst:** In dit experiment worden muizen gebruikt, welke voortkomen uit eigen fok of zelf gecreëerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9 techniek, of worden verkregen van een commerciële afleveringsbedrijf of van een andere onderzoeksgroep.
**Levensstadia:** Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. De leeftijden lopen van embryonaal tot adult. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen door elkaar heen worden gebruikt.
**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 maximale hoeveelheden dieren aangevraagd:

1. Elektrofysiologische karakterisatie muis: Van 20 dieren per lijn ECGs afnemen; 50 lijnen in 5 jaar: 20 x 50 =1000 ECGs. Deze muizen zullen na het meten van de laatste ECG geofferd worden, waarbij zij dan vallen onder punt 3. Onder dit punt worden dus geen muizen geofferd.
2. Twee generaties fok nieuwe genetisch gemodificeerde lijn: 1 founder, 20 F1 muizen en 30 F2 muizen per lijn. 50 nieuwe lijnen in 5 jaar = max. **2550** muizen.
3. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie volwassen hart: Verwachting: 40 lijnen per 5 jaar (niet alle lijnen uit punt 2 worden volledig onderzocht). Per lijn 30 adulte muizen (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 15 heterozygoten, 15 homozygoten; diverse analyses) = 40 x 35 = **1400**.
4. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie neonatale hart. Per lijn 75 neonaten (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 10 heterozygoten, 10 homozygoten; 3 stadia, diverse analyses). 15

lijnen in 5 jaar: **1125**.
5. Karakterisatie van de prenatale ontwikkeling en functie: Per lijn 24 drachtige muizen, waarvan 40% E14.5 en ouder zal zijn. Gemiddeld aantal embryo's/foeten per nest: 10; 25 lijnen in 5 jaar: 14 moeders+10 moeders +(10 x 10 foeten) x 25 = **3100** muizen.
6. Regeneratie na hartinfarct: maximaal 5 lijnen per jaar. Hierbij wordt in 3 groepen per lijn (wildtypes, enkel transgen/heterozygoot en gecombineerde allelen / homozygoten) een hartinfarct geïnduceerd. Voor een volledige analyse zijn maximaal 60 muizen per lijn nodig = 300 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = **1500** muizen.

De som van de dikgedrukte getallen geeft een totaal van maximaal 9.675 dieren voor de periode van 5 jaar. Deze aantallen zullen alleen gehaald worden als voor elke lijn het maximale aantal analyses wordt uitgevoerd.

**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 zullen zoveel mogelijk van het voorwerk uitvoeren met proefdiervrije methodes; te weten analyses van de werking van genetische elementen in celkweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. In vivo werken de genetische elementen in de context van het uiterst complexe proces van hartontwikkeling en ritmeregulatie. Bij deze processen spelen verschillende celtypes een rol, waarbij hun interacties en de veranderende orgaanstructuur een belangrijke rol spelen. Als gevolg van deze complexiteit is het niet mogelijk dit proces volledig in vitro na te bootsen. Om de normale en/of afwijkende ontwikkeling en functie van het hart te kunnen onderzoeken is een dierproeven noodzakelijk. We achten daarom deze dierexperimenten essentieel voor het bereiken van het onderzoeksdoel.

*Vermindering:*
We voeren een statistische berekening uit waarmee we kunnen inschatten hoe we met zo min mogelijk dieren, toch de vraag op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden. Tevens worden genetische elementen voorafgaand aan een dierproef uitgebreid bioinformatisch, in patiënten materiaal en in in vitro kweeksystemen geanalyseerd.
Door tegelijkertijd met de gezondheidsmonitoring een eerste validatie van de muizenlijn op genexpressie niveaus uit te voeren, kan al in een vroeg stadium bepaald worden of de genetische verandering in de muizenlijn een voldoende groot effect heeft voor het beoogde onderzoek. Mocht dit niet het geval zijn, dan wordt de lijn getermineerd en zullen er dus geen verdere experimenten met deze lijn worden uitgevoerd. Deze stap zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren, maar ook van het aantal muizenlijnen dat in onderhoudsfok staat. Op grond van deze eerste genexpressie analyse zal per lijn bepaald worden welke van de experimenten de beste informatie zullen opleveren over het effect van de modificatie. Met andere woorden, niet alle in deze aanvraag beschreven experimenten zullen op alle te genereren muizenlijnen worden uitgevoerd.
Door zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor deze experimenten worden er minder dieren uit voorraad gedood dan bij het gebruikt van slechts een geslacht.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen, zonder dat hier een nieuwe dierproef voor hoeft te worden ingezet. Meerdere ECGs kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde dier om de technische variatie te verkleinen en eventuele tijdsgebonden processen te volgen.

*Verfijning:*
Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van ritme in de mens [redacted]). We nemen ECGs af van muizen omdat het ECG de voorkeursmethode in de kliniek is om elektrische hartfunctie van patiënten te meten. Dit maakt het mogelijk om de bevinding in de muis te transleren naar de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. Daarnaast worden de analysemethodes zoveel mogelijk verfijnd en hebben we geïnvesteerd in nieuwe ECG apparatuur waarmee we hoogwaardige ECGs kunnen afnemen.
De verdere karakterisering van hartfunctie wordt ex vivo uitgevoerd met behulp van een Langendorff-perfusie-opstelling. Met deze methode is het mogelijk een zeer hoge resolutie in tijd en ruimte te bereiken waardoor kleine maar significante verschillen met een minimaal aantal muizen kunnen worden aangetoond.
Deze meeting en interventies zullen door ervaren analisten worden uitgevoerd, zodat technische mislukkingen tot een minimum worden beperkt.
Wanneer er embryo's of foeten moeten worden geïsoleerd, zal het vrouwtje alleen worden geofferd wanneer zij uiterlijk kenmerken van drachtigheid vertoond. Wanneer wel een zwangerschap wordt verwacht en er geen of onvoldoende uiterlijke kenmerken zijn, dan zal met een echo bepaald worden of het vrouwtje daadwerkelijk drachtig is. Bij weghalen bij moeder van pups tot speenleeftijd (21 dagen) er altijd zorg voor worden gedragen dat er 2 pups bij de moeder achterblijven om stuwing van de moedermelk en borstontsteking te voorkomen.
De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk weer teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze steeds maar kort aan de mogelijke stress door de handelingen blootstaan. Alle dieren in experiment worden heel regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. Tijdens en na de MI operatie wordt pijnstilling gegeven.

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

Door de dieren voor het euthanaseren door middel van cervicale dislocatie te bedwelmen met $CO_2$, wordt pijn en angst voor de dieren tot een minimum beperkt.
In een klein deel van de muizen wordt [redacted] toegediend. Het toedienen wordt gedaan door biotechnici die veel ervaring hebben om het ongerief tot een minimum beperkt.
Bij muizen met een hartinfarct zal goede monitoring helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd. Pijnstilling wordt systemisch en lokaal gegeven tijdens en na operaties.
Alle dieren worden op D1 niveau gehuisvest.

## 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.

Na de hartinfarct (MI) operatie zullen de muizen individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat kooigenoten de hechtingen openknagen wat tot ernstig ongerief leidt. Tevens hebben we in het verleden waargenomen dat wanneer een kooigenoten meer ongerief ondervinden dan een van de andere kooigenoten, de kooigenoot met het minste ongerief dominant gedrag vertoont, wat het ongerief van de andere kooigenoten versterkt. Dit gedrag is sterker bij mannen dan bij vrouwen.
De mannelijke muizen worden maximaal 1 maand individueel gehuisvest, aangezien het samen huisvesten van mannelijke muizen na separatie niet mogelijk is zonder kans op vechten. De vrouwelijke muizen worden maximaal 1 week individueel gehuisvest, zodat de wond optimaal kan genezen. Hierna worden zij weer in groepsverband gehuisvest.

**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.

Om pijn bij embryo's en foeten te voorkomen wordt de uterus met de embryo's/foeten overgebracht naar ijskoude fysiologische zout oplossing. Door de hypothermie zullen de embryo's overlijden en de foeten verdoofd raken. De foeten worden vervolgens gedood door decapitatie.

Wanneer een ECG afgeleid wordt zal het dier verdoofd worden met isofluraan omdat de dieren stil moeten liggen om een betrouwbaar ECG af te kunnen leiden. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na de afname van het laatste ECG wordt het dier gedood voordat het bijkomt uit de narcose, en worden de organen geïsoleerd voor analyse. Door deze handelingen te combineren wordt het ongerief beperkt.

Na de kransslagader ligaties voor de hartinfarct experimenten kunnen de muizen pijn ondervinden. De operaties gebeuren onder algehele verdoving en de muizen worden voor/tijdens en na de operatie behandeld met pijnstilling. De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen na de operatie pijnstilling ontvangen. De dieren zullen tijdens de operatie op een warmtemat worden geplaatst. Daarnaast krijgen de dieren minimaal 3 dagen na de operatie hoogenergetisch natgemaakt voer. De dieren worden minimaal 1 week dagelijks gemonitord, en zodra de situatie het toelaat twee keer per week gemonitord.

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Echo om jonge zwangerschap vast te stellen: Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn (ongerief: licht).

Toediening t[redacted].

Fok met risico op ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij injectie t[redacted]: irritatie van plaats van injectie.

Bij fok met ongerief: het eventuele ongerief als gevolg van de genetische modificatie zal zich waarschijnlijk uiten in hartfalen.

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

De toedieningen worden uitgevoerd door ervaren biotechnici.

Als het risico op ongerief groot is (meer dan een kwart van de dieren heeft ernstig ongerief) zal de lijn getermineerd 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.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Algemeen: Bij het bereiken van humane eindpunten, zoals het ontwikkelen van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, afwezige voedselinname, of diarree – over een periode van 2-3 dagen, het aantreffen van wonden, of meer dan 10% gewichtsverlies in een week.

Hartinfarct operatie: Tijdens operatie: veel bloedverlies. De eerste week postoperatief: ernstige infectie van de wond, 15% gewichtsverlies ten opzichte van gewicht voor operatie. Uitingen van acuut hartfalen: verminderde activiteit, slecht poetsen, extreme kortademigheid, opgebolde rug, als er de dieren weer op uitgangsgewicht gekomen zijn, 8% gewichtsverlies in 1 dag of meer dan 10% in 2 dagen.

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

Minder dan 1% voor alle niet invasieve experimenten en voor de muizen die een hartinfarct ondergaan verwachten we dat dit 20% is[redacted]

## 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.

De voor de meeste muizen die op dit protocol worden gebruikt, wordt het ongerief geclassificeerd als licht omdat er bij deze muizen geen handeling worden uitgevoerd voor het doden (max. 8175 muizen).

Wanneer er tijdens het leven van een muis een ECG afgenomen wordt, dan wordt het ongerief geclassificeerd als matig als gevolg van het bijkomen uit de narcose (max. 1000 muizen).

Voor een muis waaraan [redacted] wordt toegediend, wordt het ongerief geclassificeerd als licht (afhankelijk van gebruik aantal conditionele lijnen (max 1000 muizen) + 500 muizen na infarct).

[redacted] De muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1200).
20% van de geopereerde muizen (max. 300), [redacted] kunnen hartfalen ontwikkelen. Dit valt onder de humane eindpunten en deze muizen zullen bij constatering direct gedood worden. Door het uitvoeren van de humane eindpunten blijft het ongerief als matig geclassificeerd. [redacted]

## 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 organen geïsoleerd 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

11.

[redacted]

**Van:** [redacted]) namens Info-zbo
**Verzonden:** woensdag 20 september 2017 14:53
**Aan:** [redacted]
**CC:** [redacted]
**Onderwerp:** RE: Aanhouden AVD1180020172348

Geachte meneer, mevrouw,
Op 18 september 2017 hebben wij aanvullende informatie van u ontvangen over uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348.

Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin u de term 'intraperitoneale injectie' anders beschrijft of uitlegt? Deze term is voor een leek niet begrijpelijk. Kunt u in de NTS onder 3.5 ook aangeven hoeveel dieren, in aantal of percentage, naar verwachting welke cumulatieve ongeriefsclassificatie zullen ondergaan?

Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin u onder K het aantal of percentage van iedere cumulatieve ongeriefsclassificatie aangeeft? Een optelling van de door u gehanteerde getallen geeft een hoger aantal dieren dan waar de aanvraag betrekking op heeft. Hierdoor is het niet duidelijk hoeveel dieren welk ongerief ondergaan.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze e-mail op.
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 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

12.

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.<br><br>*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.* | Volgnummer: 1<br>Type dierproef: Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart |

## 2 Beschrijving dierproeven

**A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters**

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

In dit type dierproef bestuderen we de rol van genen en regel-elementen in de ontwikkeling, (elektrische) functie en regeneratie van het hart. We onderzoeken genetisch gemodificeerde muizen, reeds bestaand of verkregen via "genome editing" (CRISPR-Cas9). Het betreft knock-outs, knock-ins en gecombineerde transgenen ([redacted]-induceerbare knock-outs (Cre-loxP) of gecombineerde modificaties). We onderzoeken in deze muizen de effecten van de gemodificeerde genen en regel-elementen op de 1) ontwikkelingen van hart we via isolatie van embryo's en foetussen, 2) (elektrische) functie van het hart door het meten van electrische en optische signalen, en 3) regeneratieve response van het hart door chirurgisch induceren van een hartinfarct.
Op diverse niveaus en leeftijden wordt de ontwikkeling, functie en regeneratie van het hart bestudeerd, opgedeeld in de volgende onderdelen:

**1. Gezondheid monitoring en initiële analyse van nieuwe genetisch gemodificeerde lijnen**

Nadat we founders krijgen van de [redacted], zullen deze 2 generaties gefokt worden terwijl de gezondheid gemonitord wordt. Om tijd en dieren te sparen worden jonge muizen (4-8 weken) van de tweede generatie gebruikt voor een initiële analyse van genexpressie in geïsoleerde weefsels om te bepalen of de modificatie in de nieuwe lijn een biologisch effect heeft. Uitkomstparameters: effecten op niveau van genexpressie.

**2. Elektrofysiologische karakterisatie muis**

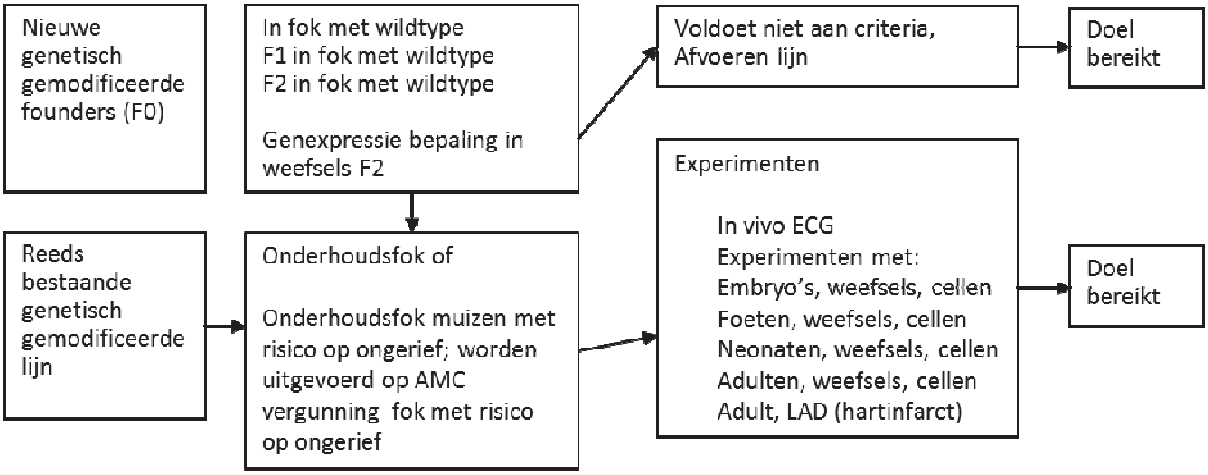
In dit experiment testen we of de genetische modificatie leidt tot elektrofysiologische veranderingen van het hart. We zullen levende transgene muizen onderzoeken onder anaesthesie met behulp van een elektrocardiogram (ECG). uitkomstparameters: QRS-duur, PR-interval, hartritme en QT-tijd.

**3. Karakterisatie ontwikkeling en functie**

In dit experiment worden muizen (embryonale dag 7.5-18.5, neonaat tot en met adult) geofferd zonder voorafgaande handeling om hieruit weefsels te isoleren. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.

**4. Regeneratie na hartinfarct**

In volwassen transgene en controle dieren zal een hartinfarct (MI) worden geïnduceerd. In een deel van de dieren wordt op verschillende momenten na de inductie een stof (eiwitoplossingen zoals [redacted]) ingespoten die regeneratie stimuleert ([redacted]) (veroorzaakt geen additioneel ongerief). Tevens wordt voor, tijdens en na het induceren van het infarct een een ECG afgenomen onder anesthesie. Aan einde van dierproef worden weefsels geïsoleerd voor verdere analyse. Uitkomstparameters: structurele/functionele/moleculaire veranderingen van weefsels/organen.




Alle experimenten hierboven beschreven staan in het teken van het ophelderen van de functie van geselecteerde genen en regel-elementen in de ontwikkeling, regeneratie en elektrofysiologische functie van het hart, en de bijdrage van modificaties in deze genen en regel-elementen aan aangeboren hartafwijkingen, regeneratie en ritmestoornissen.

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.

**Twee generaties fok en initiële analyse nieuwe genetisch gemodificeerde lijn.**

Handeling: offeren van muis zonder voorafgaande handeling

De founder (F0) wordt gekruist met een wildtype dier. De eerste generatie nakomelingen (F1) wordt gecontroleerd op kiembaan transmissie van de modificatie. Gemodificeerde dieren worden gebruikt voor het genereren tweede generatie (F2). 5 transgene F2 muizen en 5 wildtype nestgenootjes worden geëuthanaseerd om weefsels te isoleren voor genexpressie bepaling (qPCR). 5 dieren worden aangehouden om naar de fokunit over te plaatsen om de lijn aan te houden, tenzij de genexpressie analyse uitwijst dat de modificatie geen biologisch effect heeft. In dat geval wordt de lijn getermineerd. Van alle muizen wordt de gezondheid gemonitord. Bij vaststelling risico ongerief wordt de lijn overgeplaatst op protocol fokken met ongerief risico.

**Het meten van het ECG van levende muizen**.

Handelingen: Afnames van ECGs op verschillende tijdsmomenten.

Aanpak: De muizen worden verdoofd met 4% isofluraan in 1L/min $O_2$ waarna aan alle vier de poten een elektrode zal worden bevestigd. Gedurende vijf minuten zal een ECG worden afgeleid om PQ, QRS, RR en QT intervallen te bepalen. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na het laatste ECG wordt de muis gedood en het hart geïsoleerd en verder geanalyseerd. Het ECG geeft inzicht in de elektrische functie van het hart en is een non-invasieve methode waardoor we eenzelfde muis op

verschillende tijdsmomenten kunnen te bemeten.

**Weefsel isolatie uit embryo's, neonaten en volwassen dieren**
Handelingen: offeren van muis zonder voorafgaande handeling.
Aanpak: voor adulten, offeren van de muis en daarna weefsel isolatie. Het doden van dieren wordt gedaan volgens richtlijn 2010/63/EU (ongerief licht).
Voor neonaten: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt, blijft het koppel instaan en uit dit koppel worden pups geboren. Deze worden op verschillende dagen na de geboorte (neonatale stadia) geanalyseerd. Op de dag van isolatie zullen de pups van de moeder worden weggenomen. Offeren van pups en daarna weefsel isolatie.

Kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt.
Handeling adulten: [redacted] injecties; offeren
Aanpak: Muizen worden voor inductie van de genexpressie behandeld met [redacted] voor max 4 dagen. Intraperitoneale toediening (ongerief licht) of oraal toedienen dmv een gavage naald (ongerief licht) of intragastraal toedienen dmv injectienaald (ongerief licht). Volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [redacted].

**Embryo/foeten isolatie**
Handelingen: muis drachtig laten worden; echo; [redacted] injecties; offeren
Aanpak: Een koppel wordt ingezet en de vrouw wordt iedere ochtend gecontroleerd op een plug. Zodra er een plug is geconstateerd wordt het koppel uit elkaar gehaald. De plug wordt gezien als embryonaal stadium (E)0.5. Er zullen embryo's en foeten geïsoleerd worden vanaf E7.5 tot en met E18.5. Als er vroege stadia embryo's worden geïsoleerd (tot en met E10.5), zal er eerst een echo gemaakt worden om te kijken of de muis daadwerkelijk drachtig is. Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn. Vanaf E11.5 is het voor de dierverzorgers met het oog zichtbaar of het vrouwtje drachtig is of niet. In het geval van een kruising waarbij met een conditionele knock out wordt gewerkt, zal [redacted] worden toegediend aan de moeder. Na het offeren van de drachtige muis wordt de uterus verwijderd en in ijskoude PBS gedaan. In deze ijskoude PBS worden de embryo's geïsoleerd. Deze zullen worden gefixeerd in 4% PFA of bevroren worden in vloeibare stikstof. Embryo's ouder dan E12.5 worden eerst gedecapiteerd en de borstkas wordt geopend zodat de formaldehyde beter doordringt tot hart en andere organen.

**Inductie hartinfarct**
Handeling: bloedafnames; [redacted] injecties; kransslagaderligatie
Onder algehele anaesthesie en adequate analgesie zal bij de muizen een permanente ligatie van de linker kransslagader worden aangebracht (ongerief matig). De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen voor/tijdens en na de operatie pijnstilling krijgen. Voorafgaand aan de operatie wordt bloed afgenomen voor biochemische/immunologische bepalingen, volgens richtlijn https://www.nc3rs.org.uk/mouse-decision-tree-blood-sampling (ongerief licht). Na de operatie worden de muizen individueel gehuisvest om goed te kunnen herstellen. De dieren zullen na de operatie voor een bepaalde periode gevolgd worden. In subgroepen dieren wordt meermaals een stof ingespoten, zoals opgeloste eiwitten [redacted], die een invloed heeft op regeneratie-gerelateerde processen (volumina voor elke toedieningsroute volgens richtlijn [redacted]., ongerief gering). Na deze periode zal van de dieren een ECG worden afgeleid onder anesthesie waarna het dier wordt geofferd voor weefselisolatie.

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

Power berekeningen, met een power van 0.8 en een alpha van 0,05, worden gebruikt om het minimum aantal benodigde dieren te berekenen dat nodig is om een bestaand verschil statistisch significant waar te nemen, zoals 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/). Om een verschil tussen de gemiddelden van de twee groepen te meten, is het nodig te weten hoe groot dat verschil is ten opzichte van de standaard deviatie in ieder van de groepen. Voor een relatief verschil (experimenteel ten opzichte van controle) is een schatting van de standaard deviatie van deze ratio nodig. Aangezien we op dit moment geen experimentele data hebben mbt de individuele genen, nemen we voor de schatting de grootste bron van variatie, de biologische variatie, waarvan we uit eerdere experimenten weten dat die tussen de 20 en

30% (CV=0.2 -0.3) ligt. Aangezien de biologische variatie voor zowel de controle als de experimentele groep geldt, kan hieruit met doorwerking van fouten de standaard deviatie van de ratio worden berekend (SD-ratio). In onderstaande tabel staat voor een aantal mogelijke relatieve verschillen en een reeks van CVs het minimaal aantal dieren per groep dat nodig is om het verschil aan te tonen als het werkelijk aanwezig is.

| | |
|---|---|
| alpha | 0.05 |
| power | 0.8 |

| | CV (Biologische variatie | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0.1 | 0.2 | 0.25 | 0.3 | 0.4 |
| | SD-Ratio | | | | |
| Rel Verschil | 0.14 | 0.28 | 0.35 | 0.42 | 0.57 |
| 1.25 | 5.0 | 20.1 | 31.4 | 45.2 | 80.4 |
| 1.50 | 1.3 | 5.0 | 7.8 | 11.3 | 20.1 |
| 2.00 | 0.3 | 1.3 | 2.0 | 2.8 | 5.0 |
| 2.50 | 0.1 | 0.6 | 0.9 | 1.3 | 2.2 |
| 3.00 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.3 |
| 5.00 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.2 | 0.3 |

Wanneer er experimentele waardes uit pilotexperimenten bekend zijn, zal er met de gegevens powerberekening wordt uitgevoerd met software voor groepsgrootteberekeningen (bijv. nQuery, PiFace en GPower). De aantallen uit tabel die in rood zijn aangegeven vinden wij niet acceptabel. Eerder gepubliceerde onderzoeken van onze groep laten zien dat een groepsgrootte tussen 5 en 10 dieren vaak voldoende blijkt om functioneel relevante verschillen aan te tonen.([redacted]

[redacted]-

**B. De dieren**

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

**Diersoorten:** Muizen, 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.
**Herkomst:** In dit experiment worden muizen gebruikt, welke voortkomen uit eigen fok of zelf gecreëerd zijn met behulp van CRISPR/Cas9 techniek, of worden verkregen van een commerciële afleveringsbedrijf of van een andere onderzoeksgroep.
**Levensstadia:** Afhankelijk van de vraagstelling worden dieren met een bepaalde leeftijd gebruikt. De leeftijden lopen van embryonaal tot adult. Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen door elkaar heen worden gebruikt.
**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 maximale hoeveelheden dieren aangevraagd:

1. Elektrofysiologische karakterisatie muis: Van 20 dieren per lijn ECGs afnemen; 50 lijnen in 5 jaar: 20 x 50 =1000 ECGs. Deze muizen zullen na het meten van de laatste ECG geofferd worden, waarbij zij dan vallen onder punt 3. Onder dit punt worden dus geen muizen geofferd.
2. Twee generaties fok nieuwe genetisch gemodificeerde lijn: 1 founder, 20 F1 muizen en 30 F2 muizen per lijn. 50 nieuwe lijnen in 5 jaar = max. **2550** muizen.
3. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie volwassen hart: Verwachting: 40 lijnen per 5 jaar (niet alle lijnen uit punt 2 worden volledig onderzocht). Per lijn 30 adulte muizen (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 15 heterozygoten, 15 homozygoten; diverse analyses) = 40 x 35 = **1400**.
4. Functionele, structurele, moleculaire karakterisatie neonatale hart. Per lijn 75 neonaten (5 wildtype (controle groep gedeeld tussen lijnen), 10 heterozygoten, 10 homozygoten; 3 stadia, diverse analyses). 15

lijnen in 5 jaar: **1125**.
5. Karakterisatie van de prenatale ontwikkeling en functie: Per lijn 24 drachtige muizen, waarvan 40% E14.5 en ouder zal zijn. Gemiddeld aantal embryo's/foeten per nest: 10; 25 lijnen in 5 jaar: 14 moeders+10 moeders +(10 x 10 foeten) x 25 = **3100** muizen.
6. Regeneratie na hartinfarct: maximaal 5 lijnen per jaar. Hierbij wordt in 3 groepen per lijn (wildtypes, enkel transgen/heterozygoot en gecombineerde allelen / homozygoten) een hartinfarct geïnduceerd. Voor een volledige analyse zijn maximaal 60 muizen per lijn nodig = 300 muizen per jaar x 5 (voor 5 jaar) = **1500** muizen.

De som van de dikgedrukte getallen geeft een totaal van maximaal 9.675 dieren voor de periode van 5 jaar. Deze aantallen zullen alleen gehaald worden als voor elke lijn het maximale aantal analyses wordt uitgevoerd.

**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 zullen zoveel mogelijk van het voorwerk uitvoeren met proefdiervrije methodes; te weten analyses van de werking van genetische elementen in celkweek, genetische analyses in patiëntmateriaal, bioinformatische analyses om de werking van de genetische elementen in te schatten. In vivo werken de genetische elementen in de context van het uiterst complexe proces van hartontwikkeling en ritmeregulatie. Bij deze processen spelen verschillende celtypes een rol, waarbij hun interacties en de veranderende orgaanstructuur een belangrijke rol spelen. Als gevolg van deze complexiteit is het niet mogelijk dit proces volledig in vitro na te bootsen. Om de normale en/of afwijkende ontwikkeling en functie van het hart te kunnen onderzoeken is een dierproeven noodzakelijk. We achten daarom deze dierexperimenten essentieel voor het bereiken van het onderzoeksdoel.

*Vermindering:*
We voeren een statistische berekening uit waarmee we kunnen inschatten hoe we met zo min mogelijk dieren, toch de vraag op een betrouwbare manier kunnen beantwoorden. Tevens worden genetische elementen voorafgaand aan een dierproef uitgebreid bioinformatisch, in patiënten materiaal en in in vitro kweeksystemen geanalyseerd.
Door tegelijkertijd met de gezondheidsmonitoring een eerste validatie van de muizenlijn op genexpressie niveaus uit te voeren, kan al in een vroeg stadium bepaald worden of de genetische verandering in de muizenlijn een voldoende groot effect heeft voor het beoogde onderzoek. Mocht dit niet het geval zijn, dan wordt de lijn getermineerd en zullen er dus geen verdere experimenten met deze lijn worden uitgevoerd. Deze stap zorgt voor een vermindering van het aantal proefdieren, maar ook van het aantal muizenlijnen dat in onderhoudsfok staat. Op grond van deze eerste genexpressie analyse zal per lijn bepaald worden welke van de experimenten de beste informatie zullen opleveren over het effect van de modificatie. Met andere woorden, niet alle in deze aanvraag beschreven experimenten zullen op alle te genereren muizenlijnen worden uitgevoerd.
Door zowel mannen als vrouwen te gebruiken voor deze experimenten worden er minder dieren uit voorraad gedood dan bij het gebruikt van slechts een geslacht.

We proberen per proefdier zoveel mogelijk materiaal te verzamelen en systematisch op te slaan om op een later moment alsnog te kunnen gebruiken voor nieuwe onderzoeksvragen, zonder dat hier een nieuwe dierproef voor hoeft te worden ingezet. Meerdere ECGs kunnen worden uitgevoerd op hetzelfde dier om de technische variatie te verkleinen en eventuele tijdsgebonden processen te volgen.

*Verfijning:*
Wij gebruiken muizen omdat de muis een goed model is voor de vorming van het hart en regulatie van ritme in de mens (J. Physiol. 592:4613-26, 2014). We nemen ECGs af van muizen omdat het ECG de voorkeursmethode in de kliniek is om elektrische hartfunctie van patiënten te meten. Dit maakt het mogelijk om de bevinding in de muis te transleren naar de mens. We selecteren genetische elementen die vergelijkbaar (evolutionair geconserveerd) zijn tussen mens en muis. Daarnaast worden de analysemethodes zoveel mogelijk verfijnd en hebben we geïnvesteerd in nieuwe ECG apparatuur waarmee we hoogwaardige ECGs kunnen afnemen.
De verdere karakterisering van hartfunctie wordt ex vivo uitgevoerd met behulp van een Langendorff-perfusie-opstelling. Met deze methode is het mogelijk een zeer hoge resolutie in tijd en ruimte te bereiken waardoor kleine maar significante verschillen met een minimaal aantal muizen kunnen worden aangetoond.
Deze meeting en interventies zullen door ervaren analisten worden uitgevoerd, zodat technische mislukkingen tot een minimum worden beperkt.
Wanneer er embryo's of foeten moeten worden geïsoleerd, zal het vrouwtje alleen worden geofferd wanneer zij uiterlijk kenmerken van drachtigheid vertoond. Wanneer wel een zwangerschap wordt verwacht en er geen of onvoldoende uiterlijke kenmerken zijn, dan zal met een echo bepaald worden of het vrouwtje daadwerkelijk drachtig is. Bij weghalen bij moeder van pups tot speenleeftijd (21 dagen) er altijd zorg voor worden gedragen dat er 2 pups bij de moeder achterblijven om stuwing van de moedermelk en borstontsteking te voorkomen.
De muizen worden steeds zo kort mogelijk uit hun eigen omgeving gehaald en zo snel mogelijk weer teruggezet in de kooi en in het rek, waardoor ze steeds maar kort aan de mogelijke stress door de handelingen blootstaan. Alle dieren in experiment worden heel regelmatig gecontroleerd op tekenen van ongerief. Tijdens en na de MI operatie wordt pijnstilling gegeven.

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

Door de dieren voor het euthanaseren door middel van cervicale dislocatie te bedwelmen met $CO_2$, wordt pijn en angst voor de dieren tot een minimum beperkt.
In een klein deel van de muizen wordt [redacted] toegediend. Het toedienen wordt gedaan door biotechnici die veel ervaring hebben om het ongerief tot een minimum beperkt.
Bij muizen met een hartinfarct zal goede monitoring helpen voorkomen dat het vooraf vastgestelde ongerief niveau wordt overschreden en indien de humane eindpunten worden bereikt worden de dieren geëuthanaseerd. Pijnstilling wordt systemisch en lokaal gegeven tijdens en na operaties.
Alle dieren worden op D1 niveau gehuisvest.

## 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.

Na de hartinfarct (MI) operatie zullen de muizen individueel gehuisvest worden om te voorkomen dat kooigenoten de hechtingen openknagen wat tot ernstig ongerief leidt. Tevens hebben we in het verleden waargenomen dat wanneer een kooigenoten meer ongerief ondervinden dan een van de andere kooigenoten, de kooigenoot met het minste ongerief dominant gedrag vertoont, wat het ongerief van de andere kooigenoten versterkt. Dit gedrag is sterker bij mannen dan bij vrouwen.
De mannelijke muizen worden maximaal 1 maand individueel gehuisvest, aangezien het samen huisvesten van mannelijke muizen na separatie niet mogelijk is zonder kans op vechten. De vrouwelijke muizen worden maximaal 1 week individueel gehuisvest, zodat de wond optimaal kan genezen. Hierna worden zij weer in groepsverband gehuisvest.

**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.

Om pijn bij embryo's en foeten te voorkomen wordt de uterus met de embryo's/foeten overgebracht naar ijskoude fysiologische zout oplossing. Door de hypothermie zullen de embryo's overlijden en de foeten verdoofd raken. De foeten worden vervolgens gedood door decapitatie.

Wanneer een ECG afgeleid wordt zal het dier verdoofd worden met isofluraan omdat de dieren stil moeten liggen om een betrouwbaar ECG af te kunnen leiden. Na het afleiden van het ECG komen de muizen bij van anesthesie. Na de afname van het laatste ECG wordt het dier gedood voordat het bijkomt uit de narcose, en worden de organen geïsoleerd voor analyse. Door deze handelingen te combineren wordt het ongerief beperkt.

Na de kransslagader ligaties voor de hartinfarct experimenten kunnen de muizen pijn ondervinden. De operaties gebeuren onder algehele verdoving en de muizen worden voor/tijdens en na de operatie behandeld met pijnstilling. De muizen worden gedurende de gehele operatie beademd. De muizen zullen na de operatie pijnstilling ontvangen. De dieren zullen tijdens de operatie op een warmtemat worden geplaatst. Daarnaast krijgen de dieren minimaal 3 dagen na de operatie hoogenergetisch natgemaakt voer. De dieren worden minimaal 1 week dagelijks gemonitord, en zodra de situatie het toelaat twee keer per week gemonitord.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Echo om jonge zwangerschap vast te stellen: Het vrouwtje wordt gefixeerd en geschoren, waarna er met echo kort wordt gekeken of er embryo's in de uterus aanwezig zijn (ongerief: licht).

Toediening [redacted].

Fok met risico op ongerief.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Bij injectie [redacted]: irritatie van plaats van injectie.

Bij fok met ongerief: het eventuele ongerief als gevolg van de genetische modificatie zal zich waarschijnlijk uiten in hartfalen.

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

De toedieningen worden uitgevoerd door ervaren biotechnici.

Als het risico op ongerief groot is (meer dan een kwart van de dieren heeft ernstig ongerief) zal de lijn getermineerd 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.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Algemeen: Bij het bereiken van humane eindpunten, zoals het ontwikkelen van afwezig exploratief gedrag in combinatie met tekenen van algemeen onwelzijn – gebrekkige vachtverzorging, abnormale houding, afwezige voedselinname, of diarree – over een periode van 2-3 dagen, het aantreffen van wonden, of meer dan 10% gewichtsverlies in een week.

Hartinfarct operatie: Tijdens operatie: veel bloedverlies. De eerste week postoperatief: ernstige infectie van de wond, 15% gewichtsverlies ten opzichte van gewicht voor operatie. Uitingen van acuut hartfalen: verminderde activiteit, slecht poetsen, extreme kortademigheid, opgebolde rug, als er de dieren weer op uitgangsgewicht gekomen zijn, 8% gewichtsverlies in 1 dag of meer dan 10% in 2 dagen.

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

Minder dan 1% voor alle niet invasieve experimenten en voor de muizen die een hartinfarct ondergaan verwachten we dat dit 20% is (van den Borne SW, Cardiovasc Res. 2009. 84:273-82).

**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.

De voor de meeste muizen die op dit protocol worden gebruikt, wordt het ongerief geclassificeerd als licht omdat er bij deze muizen geen handeling worden uitgevoerd voor het doden (max. **4625** muizen).

Wanneer er tijdens het leven van een muis een ECG afgenomen wordt, dan wordt het ongerief geclassificeerd als matig als gevolg van het bijkomen uit de narcose (max. **2550** muizen).

Voor een muis waaraan [redacted] wordt toegediend, wordt het ongerief geclassificeerd als licht, (afhankelijk van gebruik aantal conditionele lijnen (max **1000** muizen).
De muizen die een MI operatie ondergaan hebben matig ongerief (max. 1500). Hiervan zullen er maximaal

500 een intraperitoneale injectie hebben ondergaan met [redacted]
20% van de geopereerde muizen (max. 300) kunnen hartfalen ontwikkelen. Dit valt onder de humane eindpunten en deze muizen zullen bij constatering direct gedood worden. Door het uitvoeren van de humane eindpunten blijft het ongerief als matig geclassificeerd.

## Einde experiment

**L. Wijze van doden**

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

☐ Nee

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

Er dienen organen geïsoleerd 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

Centrale Commissie Dierproeven

13.

> 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
AVD1180020172348
**Bijlagen**
1

Datum 26 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 en 22 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof verheldering van het ongerief van de dieren in zowel de Bijlage Dierproeven als de NTS.

**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 "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Datum:**
26 september 2017
**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

**Procedure**
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 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

[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 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Ontwikkeling, regeneratie en elektrische functie van het hart" met aanvraagnummer AVD1180020172348, 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 25 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2017, ontvangen op 24 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 en 22 september 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---|---|---|
| **3.4.4.1 Karakterisatie van de ontwikkeling, regeneratie en functie van het hart** | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 9.675 | 42% Matig<br>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.

**Aanvraagnummer:**
AVD1180020172348

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:**
AVD1180020172348

# 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.