2425

08 AUG. 2017

Centrale Commissie Dierproeven

1.

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☐ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* [redacted]

☐ 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.

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

[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.

1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?

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

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

3 Over uw project

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

3.2 Wat is de titel van het project?

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

3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

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

g

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Ve licht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☒ Appendices 1

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dieranwelzijn.
- 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.

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

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'.	[redacted]
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	[redacted]
1.3 Provide the title of the project.	Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry

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.

Summary
The aim of this project is to understand how Deep Brain Stimulation (DBS) influences cognitive functions and their underlying brain circuits. This knowledge can then be used as a guide to further develop DBS as a more effective treatment for psychiatric disorders. Using a combination of neuroimaging, DBS, electrophysiology, and behavior we will investigate how brain stimulation causally influences clinically relevant cognitive behaviours (i.e., those related to psychiatric symptoms) and their underlying neural activity.

Psychiatric disorders and Deep Brain Stimulation
In recent years, invasive Deep Brain Stimulation (DBS) has shown great potential as a novel treatment strategy for several psychiatric disorders (Krack et al., 2010; Blomstedt et al., 2011; Holtzheimer and Mayberg, 2011). Deep Brain Stimulation (DBS) is a neuromodulation technique in which specific regions of the brain are electrically stimulated via neurosurgically implanted electrodes, driven by a pulse-generating pacemaker device (Fig. 1A) The technique is broadly applied in the treatment of movement disorders such as those arising from Parkinson's or Huntington's disease (Weaver et al., 2009; Bronstein et al., 2011). The success of DBS for the treatment of movement disorders is largely due to our detailed understanding of the neurocircuitry of motor modulation. Recent advances in understanding the neuroanatomy and neural mechanisms of pleasure, motivation, and reward sensitivity have opened the door for the development of DBS in the treatment of psychiatric disorders such as depression, Obsessive Compulsive Disorder (OCD), or addiction (Krack et al., 2010; Figee et al., 2011; Koning et al., 2011). At the moment, however, the use of DBS in the treatment of psychiatric disorders is still experimental and there are a lot of open questions about which psychiatric symptoms respond best to DBS, and which brain targets or stimulation settings are optimal (Holtzheimer and Mayberg, 2011). Despite extensive clinical and experimental research (e.g., Denys et al., 2010; Figee et al., 2011; van Dijk et al., 2011), it remains largely unclear why and how DBS greatly reduces psychiatric symptoms in some patients but has little effect in others (examples of reported efficacies are 58% in OCD (Van Westen et al., 2015) and 40-60% in depression (Bergfeld et al, 2017)).

The ventral striatum is one of several subcortical neural structures that are currently targeted for the treatment of psychiatric disorders (Denys et al., 2010; Koning et al., 2011; Da Cunha et al., 2015). It is part of the basal ganglia and plays a crucial role in reward-motivated behavior and cognitive control (Sesack and Grace, 2009; Humphries and Prescott, 2010). In addition, dysfunction of the ventral striatum is reported in many psychiatric disorders (Graybiel and Rauch, 2000; Figee et al., 2011; Everitt and Robbins, 2014; Haber and Behrens, 2014). The subcortex, however, is composed of complex and largely uncharted structures, which are extensively connected to a broad range of cortical regions (Averbeck et al., 2014; Forstmann et al., 2017) and clinical electrodes for deep brain stimulation, by design, are not very precise with respect to the volume of neural tissue they affect. Such electrodes typically comprise a number of contact points at different depths along the tip of the electrode (Fig. 1A, inset). After implantation, an extensive fine-tuning period commences in which clinicians deliver stimulation over (sets of) contact points with a range of stimulation strengths and frequencies, searching for a setting that most effectively reduces a patient's symptoms while causing as few as possible side-effects. Sometimes such a setting is found within days, sometimes it takes months, and sometimes it is not found at all. Apart from influencing neural activity in the original target area for implantation, DBS electrodes are furthermore likely to affect passing fiber bundles and hence the distal cortical regions to which they connect (Figee et al., 2013; Munckhof et al., 2013; Alhourani et al., 2015). Such small deviations in electrode position, estimated to occur in >50% of patients (Munckhof et al., 2013), as well as differences in stimulation amplitude will have relatively large consequences on which brain networks are modulated and, by extension, which cognitive functions are influenced.

To summarize, there is great potential for the application of DBS as a treatment option in psychiatry, but to take full advantage of this potential we need additional knowledge to overcome the following issues:

1. It is currently unknown what brain area should be stimulated to treat a particular psychiatric disorder/symptom.
2. It is currently unknown how the effects of DBS depend on stimulation parameters like amplitude and frequency, and whether this depends on the precise stimulation target.
3. It is currently unknown how different cognitive functions are simultaneously influenced by DBS. Such knowledge is helpful in minimizing unwanted side-effects of DBS.

Deep Brain Stimulation and reward-based decision-making for goal-directed behavior in Psychiatric Disorders
DBS of subcortical structures has already shown great potential for several psychiatric disorders. DBS of

the ventral striatum, for instance, has yielded success in OCD, depression and addiction (Greenberg et al., 2006; Van Laere et al., 2006; Bewernick et al., 2010; Denys et al., 2010; Figee et al., 2013; Kohl et al., 2014; Schlaepfer, 2015). Many symptoms associated with these disorders fall within the general cognitive theme of reward-based decision-making for goal-directed behavior (in RDoC terms: 'Positive Valence Systems'). For example, a recent study broadly investigated impulsivity, decision-making and reward processing in OCD patients. It reports that such patients are generally overly impulsive, in that they prefer immediate rewards despite future negative consequence and they do not learn from loss (Grassi et al., 2015). Patients suffering from major depression, on the other hand, have been reported to show impaired integration of reinforcement history resulting in an inability to adapt their behavior based on reward (Vrieze et al., 2013).

Subcortical structures like the basal ganglia, together with the (frontal) cortical regions to which they project, are involved in these cognitive functions and often implicated in psychiatric disorders (Fig. 1B). We closely collaborate with a local psychiatric clinic that specializes in DBS treatment. In the clinic, patients are routinely tested on range of cognitive tasks (e.g., reward processing, decision making, impulsivity) in an attempt to characterize their symptoms in basic cognitive terms. By searching for phenomenological patterns in patients' performance and relating this to DBS treatment efficacy, clinicians hope to find predictors and biomarkers that might in the future be used to select patients with the highest chance of successful treatment. This approach can however only provide post-hoc information. Making current DBS treatments more effective by solving which brain areas should be stimulated with what stimulation parameters requires a systematic investigation of the effects of DBS on these basic cognitive functions and their neural correlates. This is not possible in humans as it requires repeated invasive brain stimulation at multiple locations and with different stimulation settings. Electrodes in patients are in a fixed location which severely limits the possibility for systematic investigation. A systematic investigation of the effects of DBS on cognitive functions thus requires an animal model. Because of the clinical relevance of our project, it is partially financed by the psychiatric clinic. We also bilaterally discuss experimental designs in joint research meetings and results will published in joint scientific publications. This collaboration ensures that the fundamental research as optimally informed by clinical demand and novel insights from fundamental research can be used to guide treatments in the clinic at the shortest possible delay.

We will capitalize on the possibility to monitor the brain-wide neural consequences of DBS by combining it with functional magnetic resonance imaging in animals (fMRI)(Knight et al., 2013; Arsenault et al., 2014; Min et al., 2014)(Fig. 1C,D). This is also only possible in experimental animals because, while patients can be scanned while their DBS system is switched off, clinical DBS systems cannot be switched on and off inside an MRI scanner due to the risk for induction currents and heating of the electrode material. It has therefore remained unknown how DBS targets influences the activity in the cortex and other subcortical structures. In experimental animals, it is much more feasible to combine stimulation and imaging because the stimulator can be kept at a safe distance from the magnetic field (in humans, the pulse generator is implanted under the collar bone), and electrode leads can be better shielded against interference. This greatly reduces the risk for unwanted currents or material heating. Furthermore, we will take all precautions to avoid these unwanted effects by testing the stimulation in a phantom setup before the experiments with monkeys. In our previous work, we have demonstrated the feasibility of this approach (Ekstrom et al., 2008).

Combining brain stimulation and fMRI in macaques requires a sophisticated experimental infrastructure and highly developed technical expertise. There are only a few labs in the world capable of performing such experiments and our laboratory collaborates with international colleagues from the USA, UK, Belgium and China to exchange technical knowledge, experience, and expertise. While these other labs employ comparable experimental techniques, their research questions are different, which is why the behavioural effects of DBS of various "deep" brain structures and the effects on other brain regions is still only poorly understood. Combined with our unique proximity to the psychiatric clinic, this makes our project one of a kind in the world.

Questions to be answered

Using a combination of DBS and fMRI to assess network activity patterns in awake task-performing monkeys we want to unravel how Deep Brain Stimulation of neural networks, involved in cognitive functions relating to psychiatric disorders, influences brain-wide activity and cognitive behavior. To gather this knowledge, we have the following subaims:

1. Which network of areas of the cortex, basal ganglia and thalamus are activated and which ones are inactivated by DBS? If different locations in deep brain structures are targeted by

DBS, how distinct are the brain-wide networks influenced by DBS at these different locations?

2. How do the brain networks that are modulated by DBS depend on stimulation parameters such as amplitude or frequency of stimulation?
3. Do distinct DBS locations and stimulation parameters give rise to the same or different behavioural effects?

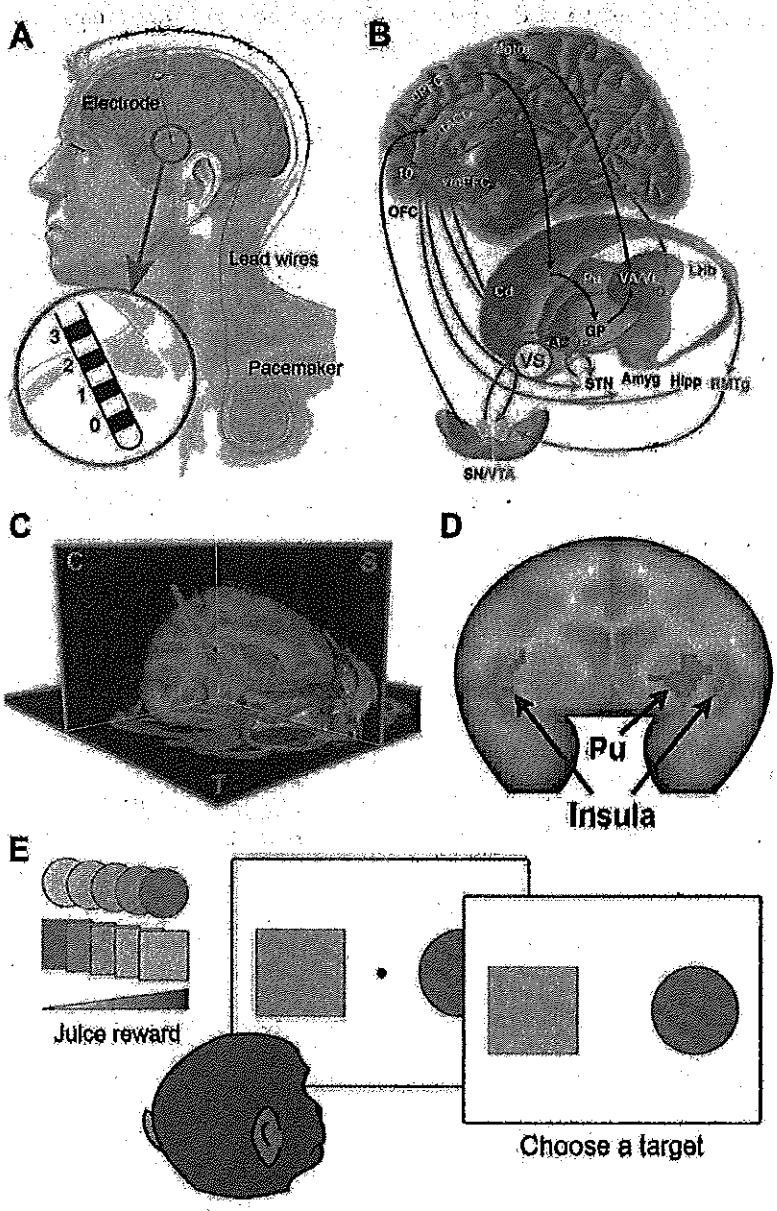


Figure 1. A) Schematic representation of a Deep Brain Stimulation (DBS) implant. A battery-powered pacemaker sends electrical pulses to a stimulation electrode with multiple contact points (inset) through a lead wire under the skin. The active electrode points are situated deep inside the brain to target subcortical structures. B) The reward circuit (red) in the basal ganglia system connects subcortical regions like the ventral striatum (VS) with cortical areas involved in cognitive and motor circuits. (adapted from Haber & Behrens, 2014) C) Electrode trajectory (orange) planning for DBS of the macaque Ventral Tegmental Area (VTA, red dot), based on structural imaging information (adapted from Arsenault et al., 2014) D) Example result from simultaneous DBS and fMRI in a macaque monkey. Stimulation of VTA evoked activation of, amongst other areas, the Putamen (Pu) and Insula. (adapted from Arsenault et al., 2014) E) Example of a cognitive task centred on reward-based decision-making. When the fixation dot in the middle of the screen disappears, the monkey makes an eye movement to one of two targets that each predicts a specific amount of juice reward, contingent upon a combination of colour and shape. In this example, light green squares are associated with more reward than dark green squares, whereas this association is the other way around for circles.

Outline of our approach:

We will perform combined DBS-fMRI experiments in healthy macaque monkeys, a species that can be trained to perform complex cognitive tasks. We choose to systematically study the neural mechanisms of DBS in healthy individuals. The reason for this is that psychiatric disorders can be highly heterogeneous with respect to the collection of symptoms that lead to a particular diagnosis and the neurobiological basis of a particular certain symptom is often

unknown. Instead of searching for an animal that emulates one particular symptom, we adopt a recently proposed strategy for psychiatric research and investigate the cognitive functions that are disturbed in a range of symptoms (Insel et al., 2010; Insel, 2014). Current research suggests that apart from some small size differences in several structures, the neural circuitry underlying psychiatric symptoms and their related cognitive functions is very similar in patients, healthy humans and animals (e.g., Norman et al., 2016). Psychiatric symptoms are thought to arise from functional imbalances in otherwise comparable circuits. It is therefore highly informative to know how DBS in a particular brain area influences the balance of neural activity in the entire network, as it might provide handles to restore imbalances observed in psychiatric disorders. To return to the examples of impaired reward-processing in psychiatric disorders given above, we can for instance investigate reward sensitivity by having the animal make a choice between two target stimuli that symbolize a different amount of juice reward. By pairing some stimuli with DBS in certain brain regions we can investigate whether DBS has any immediate reward-modulating effects, and by applying chronic DBS in some blocks of trial we can compare reward sensitivity in the presence and absence of DBS. By changing the 'rules' with which stimulus features such as shape or colour predict the amount of reward, we can investigate reward-based learning (and its dependence on DBS). Impulsivity, in turn, can be probed in a task where an animal is initially presented with reward information but needs to suppress a response because a delayed cue can appear and indicate that a particular response strategy is in fact more rewarding than the initial reward information suggested. In such paradigm, DBS in particular regions of the reward system could make the animal more or less impulsive in its reward-driven choice behavior.

We will use the macaque because the macaque neuroanatomy is highly comparable to that of humans (Haber and Knutson, 2009; Jbabdi et al., 2013; Haber and Behrens, 2014), and their reward-driven cognitive performance is similar to that of humans as well (Rushworth et al., 2009; Haber and Behrens, 2014). Previous studies have demonstrated the feasibility of combining fMRI with cortical stimulation (Ekstrom et al., 2008; Premereur et al., 2016) or with DBS (Arsenault et al., 2014; Min et al., 2014) in this species. We will train the macaques to perform cognitive tasks related to psychiatric symptoms, for instance choosing between two visual targets that are associated with different reward levels (Fig. 1E). They will perform these tasks in the MRI scanner, to reveal the neural networks involved. Finally, by carefully introducing microelectrodes into the (deep) brain regions involved, we can apply very local stimulation and monitor the effects of such stimulation on behavior and neural activity in other parts of the brain (see also Katnani et al., 2016). This can be repeated with electrodes in different locations and with different stimulation settings, resulting in causal maps that can be used as a guide for the clinical development of DBS for the treatment of psychiatric symptoms. We will also record neural activity from the deep brain regions using the same electrodes. Such physiological data could provide valuable information for the development of power-efficient closed-loop DBS implants, for which stimulation is not continuously active, but instead switched on or off based on neural activity (Da Cunha et al., 2015; Gunduz et al., 2015).

The choices we make and the behavior we display in daily life are strongly driven by expected rewards. In neural terms, such reward expectancy and/or the associated pleasure (usually associated with the release of the neuromodulator dopamine) strongly depend on the activity in relatively well-defined 'reward-circuitry' involving the basal ganglia, and their connections with cortex. In healthy humans, there is a sensitive balance between reward-sensitivity and behavioural motivation, but there are numerous psychiatric disorders in which the neural 'reward circuitry' malfunctions. Our approach of simultaneous DBS and fMRI in awake behaving macaques serves a dual purpose. First, stimulating subcortical neural structures while global brain activity patterns are simultaneously being monitored with functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) will enable us to unravel which functional and anatomical networks are modulated by DBS, and under which specific conditions. Combining these functional maps with existing knowledge of both the pathophysiology of psychiatric disorders and the functional neuroanatomy of reward and motivation mechanisms, we aim to provide

crucial information to make the clinical use of DBS for the treatment of psychiatric symptoms much more efficient in the future. Second, by monitoring the effects of direct brain stimulation on global brain activity and cognitive behavior, we will gain fundamental insights into the neural basis of reward sensitivity, motivation, and cognitive flexibility. These findings will complement ongoing research aimed at revealing the neurophysiological processes of decision-making and reward-driven behavior.

Our approach requires a species with comparable neuroanatomy to the human and the ability to perform cognitive tasks that are relevant to the psychiatric symptoms for which these patients are typically treated. While in rodents, the nodes of the relevant neural circuits are similarly interconnected, they are differently located relative to each other. In addition, rodent brains are much smaller than primate brains and their frontal cortex is far less developed, which makes it difficult to translate distal stimulation effects in rodents to the scale of the human brain. While certain aspects of the neurobiology of psychiatric disorders and their interaction with DBS can definitely be studied in rodents, the cognitive and brain-wide consequences of clinically relevant DBS cannot. We actively collaborate with a group in our institute that investigates psychiatric disorders and DBS in rodents. Experimental designs and results are discussed in regular meetings that include clinicians, the rodent research group, and the monkey research group. This unique research environment allows us to optimize our (monkey and rodent) research for clinical relevance and gives the clinicians direct access to the latest research results for further development of treatments.

The research described in this application has already commenced under an earlier DEC-approved protocol, before the new law came into effect. Under this (and another) DEC protocol we have established the infrastructure for fMRI experiments with awake behaving monkeys. We have verified that we can use fMRI in awake monkeys to localize a functional network of brain areas that is activated by visual stimulation and/or the reception of juice rewards. Currently, we are investigating whether we can also unravel more detailed activation patterns using the same technique. As a next step, we will introduce electrical brain stimulation and investigate stimulation-induced activity patterns. Under the current licenses, we are working with two macaques that will both be transferred to the new license after it has been obtained (new working protocols will be submitted). We estimate that to be able to test the effects of DBS in several stimulation targets on several cognitive behaviours, we will need data from at least four animals (an additional 2) due to the expected variability across individuals. Moreover, it could still be possible that results from these animals is contradictory, or that ethical considerations (humane endpoint) require the termination of an animal. In such cases, the acquisition of data from up to five animals may be required. The acquisition of any additional animal (surpassing the initial 4) will be performed in consultation with the institute's Animal Welfare Body (IvD).

References

Alhourani A, McDowell MM, Randazzo M, Wozny T, Kondylis E, Lipski WJ, Beck S, Karp JF, Ghuman AS, Richardson RM (2015) Network Effects of Deep Brain Stimulation. J Neurophysiol:jn.00275.2015-24.

Arsenault JT, Rima S, Stemmann H, Vanduffel W (2014) Role of the Primate Ventral Tegmental Area in Reinforcement and Motivation. Curr Biol:1–7.

Averbeck BB, Lehman J, Jacobson M, Haber SN (2014) Estimates of Projection Overlap and Zones of Convergence within Frontal-Striatal Circuits. J Neurosci 34:9497–9505.

Bergfeld IO, Mantione M, Hoogendoorn MLC., Ruhé HG, Notten P, van Laarhoven J, et al. (2016). Deep Brain Stimulation of the Ventral Anterior Limb of the Internal Capsule for Treatment-Resistant Depression. *JAMA Psychiatry*, *73*(5), 456–9.

Bewernick BH, Hurlemann R, Matusch A, Kayser S, Grubert C, Hadrysiewicz B, Axmacher N, Lemke M, Cooper-Mahkorn D, Cohen MX, Brockmann H, Lenartz D, Sturm V, Schlaepfer TE (2010) Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. Biol Psychiatry 67:110–116.

Blomstedt P, Sjöberg RL, Hansson M, Bodlund O, Hariz MI (2011) Deep brain stimulation in the treatment of depression. Acta Psychiatr Scand 123:4–11.

Bronstein JM et al. (2011) Deep brain stimulation for parkinson disease: an expert consensus and review of key issues. Arch Neurol 68:165–165.

Da Cunha C, Boschen SL, Gómez-A A, Ross EK, Gibson WSJ, Min H-K, Lee KH, Blaha CD (2015) Toward sophisticated

basal ganglia neuromodulation: Review on basal ganglia deep brain stimulation. Neurosci Biobehav Rev:1-25.
Denys D, Mantione M, Figee M, van den Munckhof P, Koerselman F, Westenberg H, Bosch A, Schuurman R (2010) Deep brain stimulation of the nucleus accumbens for treatment-refractory obsessive-compulsive disorder. Arch Gen Psychiatry 67:1061-1068.
Ekstrom LB, Roelfsema PR, Arsenault JT, Bonmassar G, Vanduffel W (2008) Bottom-Up Dependent Gating of Frontal Signals in Early Visual Cortex. Science 321:414-417.
Everitt BJ, Robbins TW (2014) Drug Addiction: Updating Actions to Habits to Compulsions Ten Years On. Annu Rev Psychol 67:150807174122003-150807174122028.
Figee M, Luigjes J, Smolders R, Valencia-Alfonso C-E, van Wingen G, de Kwaasteniet B, Mantione M, Ooms P, de Koning P, Vulink N, Levar N, Droge L, van den Munckhof P, Schuurman PR, Nederveen A, van den Brink W, Mazaheri A, Vink M, Denys D (2013) Deep brain stimulation restores frontostriatal network activity in obsessive-compulsive disorder. Nat Neurosci 16:386-387.
Figee M, Vink M, de Geus F, Vulink N, Veltman DJ, Westenberg H, Denys D (2011) Dysfunctional reward circuitry in obsessive-compulsive disorder. Biol Psychiatry 69:867-874.
Forstmann BU, de Hollander G, van Maanen L, Alkemade A, Keuken MC (2017) Towards a mechanistic understanding of the human subcortex. Nat Rev Neurosci 18:57-65.
Grassi G, Pallanti S, Righi L, Figee M, Mantione M, Denys D, et al. (2015). Think twice: Impulsivity and decision making in obsessive-compulsive disorder. *Journal of Behavioral Addictions*, *4*(4), 263-272.
Graybiel AM, Rauch SL (2000) Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. Neuron 28:343-347.
Greenberg BD, Malone DA, Friehs GM, Rezai AR, Kubu CS, Malloy PF, Salloway SP, Okun MS, Goodman WK, Rasmussen SA (2006) Three-Year Outcomes in Deep Brain Stimulation for Highly Resistant Obsessive-Compulsive Disorder. Neuropsychopharmacology 31:2384-2393.
Gunduz A et al. (2015) Proceedings of the Second Annual Deep Brain Stimulation Think Tank: What's in the Pipeline. Int J Neurosci 125:475-485.
Haber SN, Behrens TEJ (2014) The Neural Network Underlying Incentive-Based Learning: Implications for Interpreting Circuit Disruptions in Psychiatric Disorders. Neuron 83:1019-1039.
Haber SN, Knutson B (2009) The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. Neuropsychopharmacology 35:4-26.
Holtzheimer PE, Mayberg HS (2011) Deep brain stimulation for psychiatric disorders. Annu Rev Neurosci 34:289-307.
Humphries MD, Prescott TJ (2010) The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. Prog Neurobiol 90:385-417.
Insel T, Cuthbert B, Garvey M, Heinssen R, Pine DS (2010) Research domain criteria (RDoC): toward a new classification framework for research on mental disorders. Am J Psychiatry 167:748-751.
Insel TR (2014) The NIMH research domain criteria (RDoC) project: precision medicine for psychiatry. Am J Psychiatry Available at: http://ajp.psychiatryonline.org/doi/full/10.1176/appi.ajp.2014.14020138.
Jbabdi S, Lehman JF, Haber SN, Behrens TE (2013) Human and Monkey Ventral Prefrontal Fibers Use the Same Organizational Principles to Reach Their Targets: Tracing versus Tractography. J Neurosci 33:3190-3201.
Katnani HA, Patel SR, Kwon C-S, Abdel-Aziz S, Gale JT, Eskandar EN (2016) Temporally coordinated deep brain stimulation in the dorsal and ventral striatum synergistically enhances associative learning. Sci Rep 6, 18806.
Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Merikangas KR, Walters EE (2005) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry 62:593-602.
Knight EJ, Min H-K, Hwang S-C, Marsh MP, Paek S, Kim I, Felmlee JP, Abulseoud OA, Bennet KE, Frye MA, Lee KH (2013) Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation Results in Insula and Prefrontal Activation: A Large Animal fMRI Study Harel N, ed. PLoS ONE 8:e56640.
Kohl S, Schönherr DM, Luigjes J, Denys D, Mueller UJ, Lenartz D, Visser-Vandewalle V, Kuhn J (2014) Deep brain stimulation for treatment-refractory obsessive compulsive disorder: a systematic review. BMC Psychiatry 14:214.
Koning PP, Figee M, Munckhof P, Schuurman PR, Denys D (2011) Current status of deep brain stimulation for obsessive-compulsive disorder: a clinical review of different targets. Curr Psychiatry Rep 13:274-282.
Krack P, Hariz MI, Baunez C, Guridi J, Obeso JA (2010) Deep brain stimulation: from neurology to psychiatry? Trends Neurosci 33:474-484.
Min H-K, Ross EK, Lee KH, Dennis K, Han SR, Jeong JH, Marsh MP, Strlemer B, Felmlee JP, Lujan JL, Goerss S, Duffy PS, Blaha CD, Chang S-Y, Bennet KE (2014) Subthalamic Nucleus Deep Brain Stimulation Induces Motor Network BOLD Activation: Use of a High Precision MRI Guided Stereotactic System for Nonhuman Primates. Brain Stimulat 7:603-607.
Munckhof P, Bosch DA, Mantione MHM, Figee M, Denys DAJP, Schuurman PR (2013) Active Stimulation Site of Nucleus Accumbens Deep Brain Stimulation in Obsessive-Compulsive Disorder Is Localized in the Ventral Internal Capsule. In: Stereotactic and Functional Neurosurgery, pp 53-59. Vienna: Springer Vienna.
Norman, L. J., Carlisi, C., Lukito, S., Hart, H., Mataix-Cols, D., Radua, J., & Rubia, K. (2016). Structural and Functional Brain Abnormalities in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder and Obsessive-Compulsive Disorder. *JAMA Psychiatry*, *73*(8), 815-11.
Premereur E, Taubert J, Janssen P, Vogels R, Vanduffel W (2016) Effective Connectivity Reveals Largely Independent Parallel Networks of Face and Body Patches. Curr Biol:1-12.
Rushworth MF, Mars RB, Summerfield C (2009) General mechanisms for making decisions? Curr Opin Neurobiol 19:75-83.
Schlaepfer TE (2015) Deep Brain Stimulation for Major Depression-Steps on a Long and Winding Road. Biol Psychiatry 78:218-219.
Sesack SR, Grace AA (2009) Cortico-Basal Ganglia Reward Network: Microcircuitry. Neuropsychopharmacology 35:27-47.
van Dijk A, Mason O, Klompmakers AA, Feenstra MGP, Denys D (2011) Unilateral deep brain stimulation in the

nucleus accumbens core does not affect local monoamine release. J Neurosci Methods 202:113–118.
van Laere K, Nuttin B, Gabriels L, Dupont P, Rasmussen S, Greenberg BD, Cosyns P (2006) Metabolic imaging of anterior capsular stimulation in refractory obsessive-compulsive disorder: a key role for the subgenual anterior cingulate and ventral striatum. J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med 47:740–747.
van Westen M, Rietveld E, Figee M, & Denys D (2015). Clinical Outcome and Mechanisms of Deep Brain Stimulation for Obsessive-Compulsive Disorder. *Current Behavioral Neuroscience Reports*, *2*(2), 41–48.
Vrieze E, Pizzagalli DA, Demyttenaere K, Hompes T, Sienaert P, de Boer P, et al. (2013). Reduced Reward Learning Predicts Outcome in Major Depressive Disorder. *Biological Psychiatry*, *73*(7), 639–645.
Weaver FM, Follett K, Stern M, Hur K, Harris C, Marks Jr WJ, Rothlind J, Sagher O, Reda D, Moy CS (2009) Bilateral deep brain stimulation vs best medical therapy for patients with advanced Parkinson disease. JAMA J Am Med Assoc 301:63–73.

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 is to understand how deep brain stimulation of neural networks, involved in reward-related cognitive functions, influences brain-wide activity and behavior. Since aberrations in the reward system are commonly observed in psychiatric disorders, such information may be used as a guide for the improvement of deep drain stimulation as a treatment option in psychiatry.

To gather this knowledge, we have the following subaims:

1. Which network of areas of the cortex, basal ganglia and thalamus are activated and which ones are inactivated by DBS? If different locations in deep brain structures are targeted by DBS, how distinct are the brain-wide networks influenced by DBS at these different locations?
2. How do the brain networks that are modulated by DBS depend on stimulation parameters such as amplitude or frequency of stimulation?
3. Do distinct DBS locations and stimulation parameters give rise to the same or different behavioral effects?

These aims are achievable because:

1) The lab has an established primate facility and expertise in performing fMRI and microstimulation studies with awake behaving primates. Many of the techniques required to perform these experiments are already implemented in our lab. We also have ample experience in training monkeys to perform complex cognitive tasks.
2) The lab has ongoing collaborations with the psychiatrists that actively use and develop DBS for the treatment of psychiatric disorders. We also collaborate with neurosurgeons that are involved in the DBS for Psychiatry program. They share their experience on implanting human patients with DBS electrodes with us, while our approach and findings are discussed with these clinicians for optimal translational potential.
3) The lab has international collaborations with labs where technically similar experiments are performed (stimulation and neuroimaging in macaques). The active exchange of information ensures the use of state-of-the-art research techniques.
4) The lab (and others within our institute) has parallel research streams in humans (fMRI and behavior) and rodents (basic neural processing). There is continuous interplay between these different research streams so that hypotheses can be answered using the most appropriate model.
5) The lab collaborates with (human) neuroimaging groups that specifically aim to improve the existing knowledge of the subcortex. New imaging protocols that improve the anatomical and functional mapping of deep brain regions will be applied to both humans and macaques to maximize the already substantial translational potential of our work.

6) The lab has an outstanding track record of high-impact research which has led to publications in high-ranking international journals (Nature, Science, Nature Neuroscience, Neuron, PNAS, etc.).

3.3 Relevance

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

Scientific

The pursuit and expectation of reward are important determinants of behavior. The neural machinery of reward information processing includes, among other areas, the basal ganglia and their connections with a diverse set of cortical regions. In health, these mesolimbic pathways maintain a delicate balance that determines reward sensitivity and behavioral motivation. In numerous psychiatric disorders, however, the reward system malfunctions, resulting in behavioral phenotypes such as impulsivity, compulsivity, anhedonia, or addiction. By stimulating highly specific regions of the reward system while recording the consequences of such stimulation on brain-wide activity patterns and cognitive behavior, we will increase our knowledge of what is perhaps the brain's most important task of all: to provide us with a drive to live and to motivate us to behave the way we do. At the same time, these results will shed light on the nature of several cognitive functions that are commonly disturbed in psychiatric disorders and provide handles for novel and/or more refined DBS treatment strategies.

Social

Psychiatric disorders like depression, obsessive-compulsive disorder and addiction have a relatively high incidence and a significant proportion of patients is unresponsive to conventional treatment. Apart from their own personal distress (mortality rates in these disorders are high), patients present a severe social and financial burden for their friends, family and society in general (The World Economic Forum estimated the global cost of mental disorders for 2010 at $2.5 trillion, with a projected global cost of $6.0 trillion in 2030; Bloom et al., 2011). Improved DBS of the brain's reward and motivation system may help the improve the condition of some of these patients up to a level so that they can regain a normal life.

With a significant proportion (e.g., 10% in OCD; Denys, 2006) of a growing population of psychiatric patients not responding to conventional treatment, there is a great demand for novel methods. The application of DBS for the treatment of psychiatric disorders is a development that had gained great momentum over the past years with promising and encouraging results. The biggest problem with this development, however, is that it is often unclear what neural structures are being stimulated and why some settings of the stimulation parameters are effective while others do not seem to work at all. Our work will precisely map what type of stimulation activates what neural structures and how this stimulation impacts behaviour and cognition. This kind of information is crucial in (further) developing efficient and successful DBS strategies for the treatment of a range of psychiatric disorders.

References

Bloom DE et al. (2011) The Global Economic Burden of Non-communicable Diseases. Geneva: World Economic Forum.
Denys D (2006) Pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder and obsessive-compulsive spectrum disorders. Psychiatr Clin North Am 29:553–584.

3.4 Research strategy

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

The main objective of the project is to understand how Deep Brain Stimulation of neural networks, involved in cognitive functions relating to psychiatric disorders, influences brain-wide activity and cognitive behavior. Such information may be used as a guide for the improvement of Deep Brain Stimulation as a treatment option in psychiatry.

We will pursue this aim in experiments in macaque monkeys that we will train to perform cognitive tasks that are designed to probe cognitive functions related to psychiatric symptoms. These tasks can also be performed inside an MRI scanner, allowing us to measure global brain activity while the animal performs the task. Combining functional neuroimaging results with novel structural imaging paradigms will allow us to precisely pinpoint the networks underlying the targeted cognitive functions. The areas of interest for imaging are known nodes of the brain's subcortical and cortical reward-processing circuits, based on previous clinical results with deep brain stimulation and results from cognitive neuroscience. Hence, we can then use DBS to stimulate these relevant areas with a range of stimulation settings and monitor how this intervention impacts both activity throughout the brain and performance on the cognitive tasks. We can furthermore use the same (stimulation) electrodes to record neuronal data from the exact areas we target with stimulation and compare this data to our imaging results. The neurophysiological knowledge we obtain with these measurements can improve our detailed understanding of the neural mechanisms of reward related behaviours and DBS. We anticipate that the resulting functional map of brain stimulation effects will guide the identification of new DBS targets in psychiatry and may also help to improve treatment efficacy using current targets for instance by the development of closed-loop DBS systems, in which stimulation is based on, or modulated by, directly measured neural activity.

With this approach, we address our sub-aims in the following way:

Subaim 1; Which network of areas of the cortex, basal ganglia and thalamus are activated and which ones are inactivated by DBS? If different locations in deep brain structures are targeted by DBS, how distinct are the brain-wide networks influenced by DBS at these different locations?

We will first image the monkeys while they perform the cognitive task in the absence of stimulation to identify what brain areas are involved in a particular cognitive function (and measurable with fMRI). Based on these results (and existing knowledge), we can select our stimulation targets and repeat the imaging experiments with DBS in these areas. More detailed knowledge about the neurophysiological properties of the areas targeted with stimulation can furthermore be recorded from the same electrodes used for stimulation.

Subaim 2; How do the brain networks that are modulated by DBS depend on stimulation parameters such as amplitude or frequency of stimulation?

The DBS-MRI experiments described under sub-aim 1 will be repeatedly performed with different stimulation parameters to allow a straightforward comparison of the observed modulation of brain activity under different settings.

Subaim 3; Do distinct DBS locations and stimulation parameters give rise to the same or different behavioural effects?

By performing these experiments in awake behaving animals, we can simultaneously investigate the influence of DBS on behavior and brain activity as well as its dependence on stimulation location and stimulation parameters.

The combination of the brain-wide modulatory effects of DBS as measured with fMRI, its effects on behavior, and the neurophysiological signatures of the stimulated areas paints a detailed picture of the functional mechanisms of DBS and will provide guidance for improving DBS as a treatment option in psychiatry.

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.

Type of Animal Procedure 3.4.4.1 Neuroimaging (MRI), Electrical stimulation, and Electrophysiological Recordings

All the monkeys that take part in experiments at our institute follow a standardized training protocol that takes the monkey from their initial acquisition up to the point where they can perform simple tasks in daily training sessions. These initial stages have been carefully optimized and are often performed by the animal caretakers of the facility. This standardization ensures a very high success rate acclimatizing monkeys to the facility and the training routine. Monkeys are obtained from a national primate center or, in exceptional cases, from licensed importers if there are no suitable animals available at the primate centre. They are socially housed in the facility, typically in pairs. After acclimatization to the new environment the monkeys are trained to move into a primate chair that allows them to be moved comfortably from their home-cage to the experimental set-up. Once the animal can quietly sit in the chair, in a sphynx position necessary for fMRI (Vanduffel et al., 2001), for periods of >1 hour, the animal undergoes a surgery to implant a head-post. The head-post is a small rod attached to the skull of the animal and it used to fixate the head of the monkey during training and later experimental recordings. This is an essential step because we train the monkey to control its eye position and these measurements are only possible if the monkey's head is fixed. Furthermore, fMRI measurements are highly susceptible to movement and reliable imaging sessions require as little movement as possible. After recovery from the head-post surgery the animal is acclimatized to having its head fixated in the chair. Most monkeys adapt very quickly to this step. The monkey then begins daily training sessions in which he acquires juice rewards for performing simple eye-movement- or hand-movement-based tasks. Initially the tasks are very simple, such as lifting a button when a bar on the computer screen changes orientation. During this process, the animal will be placed on a controlled fluid uptake regime. Gradually, the difficulty of the tasks is increased by making the bar smaller until the animal can maintain its gaze on the location on a computer screen. The animal is then taught to make eye-movements towards visual targets on the screen. These initial stages can take anywhere from a few months up to a year. At this point, the animal is ready to be transferred to the specific experimental procedures where it performs more complex perceptual or cognitive tasks (see also the FlowChart document for details on the timeline).

We will use Magnetic Resonance Imaging (MRI) to map which brain areas involved in the tasks the monkey is performing. Once an animal has reached adequate performance levels in basic tasks, we will start imaging brain activity. With structural scans, we will gather the detailed anatomical information that is necessary to plan electrode placement and co-register functional data. We will also develop and perform Diffusion Tensor Imaging (DTI) scans to visualize the structural connectivity between areas. These detailed structural scans will largely be performed under anaesthesia because they are extremely sensitive to distortions as a result of head motion. Functional scans, which are much faster and therefore less sensitive to motion artefacts, will also be done with awake, behaving animals. We will start with basic visual tasks to validate the imaging results against well-established knowledge of brain function (a high-contrast visual stimulus, for instance, activates visual cortices and subcortical structures involved in visual processing). When the imaging quality is satisfactory, we will move to the more complicated tasks designed to probe the neural networks of interest (go/no go moment). We expect that this stage of the project will take up to six months.

Functional brain activity can be measured with either the Blood Oxygen Level Derived (BOLD) signal, or with the contrast-enhanced Cerebral Blood Volume (CBV) signal. The two signals measure largely the same thing, but the signal-to-noise-ratio (SNR) of CBV is approximately three times higher than that of BOLD (Vanduffel et al., 2001; Leite et al., 2002; Mandeville, 2012). Unlike BOLD, however, CBV requires an intravenous injection of a contrast agent prior to scanning. We will use a contrast-agent approach whenever suitable to reduce the number of experimental sessions needed to obtain reliable data.

In the next part of the experiment, we will investigate the causal role of certain brain areas on brain-wide activity and cognitive behavior through electrical stimulation. Once we have established that a monkey's imaging results and performance on the cognitive asks are good, and we have obtained the structural scans required for the planning of electrode placement (go/no go), we will design and implant a maximum of two recording/stimulation chambers that will allow acute, or semi-chronic, recording or stimulation of the underlying neural tissue. The choice for one or two stimulation chambers depends on the brain areas we plan to stimulate based on neuroimaging results. If these areas can be reached from a single chamber we will only implant one. If, however, some areas require a significantly different point or angle of entry into the brain it is possible that they cannot be reached from the same chamber. In such cases, and if space permits, we will implant two chambers. If this requirement is known before the first chamber is implanted, both chambers will be implanted in the same procedure. We will initially leave the cranium intact when we place the recording chamber. We then plan the required electrode trajectory towards the target area, make a craniotomy in the recording chamber, and lower electrodes into the brain with an MRI compatible microdrive on a daily basis, which is a routine procedure in the lab. Lowering the electrode only causes mild discomfort when the electrode crosses the dura, since the brain itself does not contain any pain receptors. Usually, an animal does not show any signs of discomfort as a result of an electrode passing the dura, but if it does we apply a light local anaesthetic to the dura mater to prevent any discomfort. With electrodes in the target area, we can then either stimulate or record through these electrodes. Stimulation effects on cognitive behavior can be measured outside of the scanner, whereas neural consequences of stimulation can be obtained using stimulation in conjunction with fMRI or neurophysiological recordings. We will also perform combined stimulation-fMRI without a task to reveal the causal relationship between the target area and other brain areas. The electrodes we will use typically have a diameter that is about 5 to 10 times smaller than the clinical electrodes used in humans (<250□m). This does not only allow us to more precisely stimulate small volumes of neuronal tissue, it also greatly reduces the potential tissue damage caused by bringing an electrode into the brain. Similar electrodes are commonly used in neurophysiological studies that extracellularly record the activity individual neurons (also in our lab). In such studies, electrodes are usually entered into the brain on a daily basis. If this is carefully done, tissue damage is minimal and the same brain area can typically be recorded from for months. By repeating our experimental cycle with slightly different stimulation locations (accessible through the same chamber(s)) and slightly different stimulation parameters (e.g., frequency or amplitude) we will create a functional map of stimulation effects on brain activity and behavior. Different stimulation locations can either be along the same electrode trajectory, which only requires small displacements of the existing electrode in depth, or along a new trajectory which would require re-entry of an electrode into the brain. We will monitor the state of the tissue through the effectiveness of stimulation, neurophysiological recordings, and structural MRI (while the tissue immediately surrounding an electrode will not be visible on an MRI scan due to the susceptibility artefact caused by the electrode, scans in the absence of an electrode can readily be used to inspect the state of the tissue). Depending on initial imaging results, this part of the project can take anywhere from six months to four years.

References

Leite FP, Tsao D, Vanduffel W, Fize D, Sasaki Y, Wald LL, Dale AM, Kwong KK, Orban GA, Rosen BR, Tootell RBH, Mandeville JB (2002) Repeated fMRI using iron oxide contrast agent in awake, behaving macaques at 3 Tesla. NeuroImage 16:283–294.

Mandeville JB (2012) IRON fMRI measurements of CBV and implications for BOLD signal. NeuroImage 62:1000–1008.

Vanduffel W, Fize D, Mandeville JB, Nelissen K, Van Hecke P, Rosen BR, Tootell RB, Orban GA (2001) Visual motion processing investigated using contrast agent-enhanced fMRI in awake behaving monkeys. Neuron 32:565–577.

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 different components described above logically follow from each other (see Flowchart document) in the sense that all animals undergo the standardized training protocol, followed by an imaging stage in which we identify the brain areas involved in our cognitive tasks and select the areas we will consequently stimulate and/or record from. Together they are aimed at understanding the effects of DBS on cognitive functions derived from psychiatric symptoms, and their underlying neural circuits.

After the initial stage of the project in which we image animals while they perform cognitive tasks in the absence of DBS, there is a clear go/no-go selection moment. We can only record the neural consequences of DBS if we are able to acquire sensible imaging data from an animal, and we can only investigate the behavioural effects of DBS if an animal is capable of performing the relevant cognitive tasks. We will not proceed to performing experiments with DBS if these conditions are not met.

There is overlap between the animal studies described in this project and those in earlier DEC-approved protocol ("Neural Mechanisms of Deep Brain Stimulation"), before the new law came into effect. After a license for this project has been obtained, all proposed experiments will formally be executed under this new license and new study protocols will be submitted to the IvD to replace the current DEC protocols. Animals that are already involved in this project under earlier DEC-protocols (n=2) are included in the total number of animals required for this project. In the studies under these previous licenses, we also aim to combine electrical brain stimulation with imaging and behavior to map the neural and behavioural consequences of such brain stimulation. The aims of these studies thus contribute to the aims of the current CCD application. In the ongoing studies, we have established the infrastructure for fMRI experiments with awake behaving monkeys. We have verified that we can indeed use fMRI in awake monkeys to localize a functional network of brain areas that is activated by visual stimulation and/or the reception of juice rewards. Currently, we are investigating whether we can also unravel more detailed activation patterns using the same technique. As a next step, we will introduce electrical brain stimulation and investigate stimulation-induced activity patterns. The two animals that are currently involved in this project have been implanted with a headpost only (no intracranial implants). They are both healthy and cooperative, and there have not been any complications in their training.

We estimate that to be able to test the effects DBS in several stimulation targets, we will need data from at least four animals (an additional 2, compared to the ongoing study) due to expected variability in cognitive behaviour, anatomical accessibility of stimulation targets, and efficacy of stimulation. In neurophysiological studies with non-human primates, experiments commonly comprise only two animals. However, in such experiments, data is usually obtained from a large number of individual neurons or recording electrodes (for instance on a Utah array), a level of detail that is inaccessible to fMRI. Human neuroimaging studies generally include 10-20 participants that are scanned once or twice. Monkey neuroimaging studies, on the other hand, usually report results from between 2 and 5 animals that are each scanned numerous times to obtain reliable results. Several recent monkey fMRI studies investigating global brain networks (Ortiz-Rios, et al. 2017; Sliwa & Freiwald, 2017), reward processing (Chau, et al. 2015), and microstimulation effects (Petkov et al., 2015) all report results from four animals. Even though the novelty of our study makes it difficult to predict variability and effect sizes, we estimate that we will also be able to obtain reliable results with four animals. However, it could still be possible that results from these animals are contradictory, or that ethical considerations (humane endpoint) require the termination of an animal. In such cases, the acquisition of data from an additional animal may be required. If these circumstances arise, the acquisition of an additional animal will be performed in consultation with the Institute's Animal Welfare Body (IvD). We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 electrophysiology projects an additional monkey was required (22% chance). It remains difficult to estimate whether these odds will be similar for neuroimaging studies, but we have no a priori reason to expect them to be any

different.

References

Bergfeld IO, Mantione M, Hoogendoorn MLC., Ruhé HG, Notten P, van Laarhoven J, et al. (2016). Deep Brain Stimulation of the Ventral Anterior Limb of the Internal Capsule for Treatment-Resistant Depression. JAMA Psychiatry, 73(5), 456–9.

Chau BKH, Sallet J, Papageorgiou GK, Noonan MP, Bell AH, Walton ME, & Rushworth MFS. (2015). Contrasting Roles for Orbitofrontal Cortex and Amygdala in Credit Assignment and Learning in Macaques. Neuron, 87(5), 1106–1118.

Ortiz-Rios M, Azevedo FAC, Kuśmierek P, Balla DZ, Munk MH, Keliris GA, et al. (2017). Widespread and Opponent fMRI Signals Represent Sound Location in Macaque Auditory Cortex. Neuron, 93(4), 971–983.e4.

Petkov CI, Kikuchi Y, Milne AE, Mishkin M, Rauschecker JP, & Logothetis NK (2015). Different forms of effective connectivity in primate frontotemporal pathways. Nature Communications, 6, 6000.

Sliwa J, & Freiwald WA (2017). A dedicated network for social interaction processing in the primate brain. Science, 356(6339), 745–749.

van Westen M, Rietveld E, Figee M, & Denys D (2015). Clinical Outcome and Mechanisms of Deep Brain Stimulation for Obsessive-Compulsive Disorder. Current Behavioral Neuroscience Reports, 2(2), 41–48.

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	Neuroimaging (MRI), Electrical Stimulation, and Electrophysiological Recordings
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	Cognitieve effecten van diepe hersenstimulatie in het kader van de behandeling van psychiatrische aandoeningen.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Diepe hersenstimulatie, cognitie, psychiatrie, MRI, beloningsverwerking

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 maatschappelijk belang)

Diepe hersenstimulatie (DHS) is de neurochirurgische ingreep waarbij een of enkele elektroden in de hersenen worden ingebracht om diep gelegen hersengebieden elektrisch te kunnen stimuleren. DHS heeft zich de laatste jaren ontwikkeld tot een veelbelovende nieuwe behandelmethode voor een aantal psychiatrische aandoeningen, in het bijzonder obsessieve-compulsieve persoonlijkheidsstoornis (OCS) en depressie.

Bij sommige patiënten resulteert DHS in het verminderen of zelfs verdwijnen van de psychiatrische symptomen. Bij een belangrijk deel van de patiënten werkt de behandeling echter niet of onvoldoende. Dit komt onder andere omdat we niet goed weten waar in de hersenen precies gestimuleerd moet worden om specifieke symptomen aan te pakken, en wat voor soort

		stimulatie (sterkte – pulsduur – frequentie) we precies toe moeten passen. In dit project willen we door proeven met resusapen in kaart brengen wat de effecten zijn van DHS op hersenactiviteit en op aspecten van gedrag die vaak verstoord zijn bij psychiatrische aandoeningen. Voor het onderzoek brengen we in de hersenen van de apen elektroden aan waarvan we de exacte positie kunnen veranderen om op die manier de effecten van stimulatie in meerdere gebieden te testen.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	De kennis die we op deze manier verkrijgen draagt bij aan het begrip van de relatie tussen hersenfunctie en die gedragsaspecten die vaak verstoord zijn in psychiatrische aandoeningen. Doordat we met behulp van hersenstimulatie direct inzicht krijgen in welke rol bepaalde hersengebieden spelen bij deze gedragsaspecten levert dit onderzoek aanknopingspunten op om de behandeling van dergelijke stoornissen sterk te verbeteren. We verwachten op deze manier in de komende vijf jaar voldoende inzicht te krijgen in de effecten van DHS op cognitief gedrag om het gebruik van deze methode bij de behandeling van psychiatrische patiënten sterk te verbeteren. Hiermee krijgt een groep patiënten die alle conventionele behandelmethoden al zonder succes heeft geprobeerd (ongeveer 10%) toch weer uitzicht op een normaal leven.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor deze experimenten gebruiken we in vijf jaar tijd maximaal vijf resusapen.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Negatieve gevolgen voor het welzijn van proefdieren zijn 1) ongerief als gevolg van de chirurgische ingrepen ,verricht onder volledige anesthesie en met adequate pijnbestrijding, 2) stress tijdens het aanleren en uitvoeren van de taken.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Voor de resusapen wordt het cumulatieve ongerief, veroorzaakt door de verschillende operaties onder anesthesie, als matig geclassificeerd. Dit ongerief is telkens van korte duur. De tijd dat een aap taken uitvoert, is het ongerief te beoordelen als licht, veroorzaakt door de gereguleerde vloeistofinname en het vastzitten tijdens de metingen, gedurende twee à drie uur per dag en vijf dagen per week.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Een deel van de dieren kan participeren in andere proeven of kan na de proef met pensioen (zie het NCad advies over herplaatsing: https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing). Hergebruik of herplaatsing is afhankelijk van de doelstelling van de specifieke proef. Wanneer we inzicht willen krijgen in de mogelijke schadelijke effecten van diepe hersenstimulatie op het hersenweefsel wordt de aap gedood om de hersenen te kunnen onderzoeken onder de microscoop.

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.	Om de interacties tussen verschillende hersengebieden en hun relatie met gedrag in detail bloot te leggen, moeten gedrag en hersenactiviteit tegelijk worden gemeten en beïnvloed. Het gebruik van celculturen, of van diersoorten lager dan zoogdieren, zal daarom niet leiden tot het bereiken van onze doelstelling. Knaagdieren zijn in dit specifieke geval ook niet geschikt omdat de anatomische organisatie van de voor dit onderzoek relevante hersengebieden anders is dan bij mensen. Om de door dit onderzoek

zichtbaar gemaakte effecten van DHS te kunnen 'vertalen' naar de menselijke anatomie en om te zetten in aanbevelingen voor verbetering van -behandelmethodes in de psychiatrische kliniek, is een sterke overeenkomst in anatomische organisatie cruciaal. Onderzoek met knaagdieren zal wel worden gedaan om de rol van specifieke neurotransmitters of bepaalde celtypen in de effecten van DHS te onderzoeken.

Omdat we systematisch willen onderzoeken hoe DHS in verschillende hersengebieden de hersenactiviteit en het gedrag beïnvloedt, moeten we de elektroden op verschillende locaties in de hersenen plaatsen. Vanwege de risico's die dit met zich meebrengt is het niet verantwoord dit onderzoek te doen met gezonde vrijwilligers. Het is ook niet mogelijk dit onderzoek te doen bij patiënten die al een DHS-systeem hebben, omdat die elektroden niet verplaatst kunnen worden. Bovendien willen we de veranderingen in hersenactiviteit als gevolg van DHS direct meten met MRI-technologie, wat betekent dat we willen stimuleren in een sterk magneetveld. Ook dit is niet mogelijk bij patiënten met een DHS-systeem, omdat dat systeem werkt op een geïmplanteerde batterij. Deze factoren, gevoegd bij het feit dat de hersenstructuur van de resusaap erg op die van de mens lijkt, bepalen de keuze voor dit proefdier.

Waar mogelijk maken we ook gebruik van niet-invasieve methoden zoals MRI, EEG en psychofysica in (gezonde) mensen, maar deze metingen zijn slechts aanvullend, omdat ze ons niet in staat stellen de effecten van DHS systematisch te meten.

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

Door de verwachte variatie in gedrag, hersenanatomie en effectiviteit van de stimulatie verwachten we metingen te moeten doen bij ten minste vier dieren. Soms is het nodig meer dieren te testen (tot een maximum van vijf), bijvoorbeeld als een resusaap een bepaalde taak niet kan leren of als er duidelijke verschillen blijken te bestaan tussen de resultaten van onderzoek met de eerder geteste dieren.

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

Alle procedures (inclusief de huisvesting van de resusapen) zijn erop gericht het ongerief voor de dieren zoveel mogelijk te beperken. Er is veel bekend over de hersenen van de resusaap en dit proefdier is het enige waarbij de hersennetwerken voor bijvoorbeeld beloningsverwerking voldoende lijken op die van de mens om de effecten van DHS goed te kunnen onderzoeken.

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

1) We beperken de hoeveelheid stress zoveel mogelijk door de apen geleidelijk te laten wennen aan alle aspecten van de gedragstaken.

2) De dieren worden getraind via een regime met gecontroleerde vochtopname. Ze krijgen de benodigde hoeveelheid vocht tijdens de training. We hanteren een zorgvuldig protocol om negatieve effecten van de gecontroleerde vloeistofopname te voorkomen. In onze ervaring en bevestigd door een onafhankelijke dierenarts leidt dit protocol tot gering ongerief en zijn er geen negatieve gevolgen voor de gezondheidstoestand.

3) Alle operaties worden uitgevoerd onder anesthesie door personen die goed zijn opgeleid en een ruime ervaring hebben. Na de operaties worden pijnstillers gebruikt om postoperatieve pijn te voorkomen.

4) De dieren worden sociaal gehuisvest in tweetallen in een verrijkte

omgeving, om zo het ongerief van het leven in een kooi te beperken en om de cognitieve vermogens te verbeteren. Indien aan het einde van de proeven de dieren moeten worden gedood, gebeurt dit onder volledige anesthesie.

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'. [redacted]

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

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

Serial number	Type of animal procedure
3.4.4.1	Neuroimaging (MRI), Electrical Stimulation, and Neurophysiological Recordings

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.

This appendix describes neuroimaging and electrophysiological procedures that, together, are aimed at mapping brain areas involved in specific cognitive functions, investigating the causal effects of electrical stimulation within these areas on global brain activity and behaviour, and recording neuronal activity patterns of the stimulation target areas during the same cognitive tasks.

Our approach entails the following steps: 1) using neuroimaging to reveal which brain areas are involved in cognitive functions derived from psychiatric symptoms, and 2) investigate how brain activity and cognitive behaviour are influenced by different types of electrical stimulation with the involved regions. The fundamental knowledge obtained with this approach will guide future treatment of psychiatric disorders with (deep) brain stimulation methods. At the same time, it will improve our understanding of the neural basis of goal-directed behaviour (an umbrella term that covers many cognitive aspects commonly dysfunctional in psychiatric disorders).

To achieve this goal, monkeys will be trained to perform cognitive tasks, while we image their brain activity with an MRI scanner. These tasks can for instance require the animal to choose between targets associated with different reward levels by making hand- or eye-movements. As a second step, we will implant the animals with recording/stimulation chambers that will allow us to electrically stimulate areas targeted with DBS and monitor their neuronal activity directly. By combining the stimulation with fMRI and behaviour, we will obtain a rich data-set on the (causal) relation between brain activity and cognition that could guide future psychiatric treatment using brain stimulation.

The primary outcome parameters are:

i) The behaviour of the animal. The animal will be trained to perform complex cognitive task such as making reward-based decisions based on visual stimuli. Changes in behaviour as a function of brain stimulation provide important insights in the causal relation between the brain regions affected by stimulation and behaviour.

ii) Neuroimaging data. BOLD or contrast-enhanced CBV data measured with fMRI indicates which brain regions are involved in a particular task. Projecting these functional activity patterns onto structural information obtained with different scan-sequences in the same animal paints a detailed picture of this task-related neural substrate. Moreover, in stimulation experiments, the same functional data will indicate which parts of the brain are influenced by electrical stimulation.

iii) Neural activity recorded from the stimulation electrodes. We will examine the link between neural activity recorded from areas selected for stimulation and the cognitive tasks performed by the monkey.

All monkeys involved in this project will be acquired and acclimatized to the primate facility at our institute. They will undergo initial structural anatomical scans to check for obvious brain anomalies and to guide the design of the surgical implants. It is critical for the success of these experiments that the monkey's head is held stationary during imaging, stimulation, and neurophysiological recordings. MRI is highly susceptible to movement artefacts, and our behavioural measures require precise measurement of the animal's eye position, which is impossible if the head is moving. The animal will be implanted with an MRI-compatible head-post which allows the head of the monkey to be fixed in the experimental set-up. The monkey then begins daily training sessions in which he acquires juice rewards for performing simple eye-movement- or hand-movement-based tasks. Initially the tasks are very simple, such as lifting a button when a bar on the computer screen changes orientation. During this process, the animal will be placed on a controlled fluid uptake regime. Gradually, the difficulty of the tasks is increased by making the bar smaller until the animal can maintain its gaze on the location on a computer screen. The animal is then taught to make eye-movements towards visual targets on the screen. Training will take place in a simulated MRI environment to gradually accustom the animal to performing their task inside a scanner-bore.

After the monkey has reached a sufficient level of performance on these basic tasks, the animal will resume with more complex cognitive tasks, e.g., making choices between visual targets associated with different amounts of juice reward. In parallel, the animal will also be slowly habituated to the sound of an MRI-scanner, the handling procedures involved in injecting a contrast agent, wearing ear plugs for protection against MRI-noise, and the MRI recording situation. Once trained on all these aspects of an imaging experiment, the animals will perform their tasks inside the MRI scanner, while we record global activity. In additional sessions under anaesthesia, we will acquire fine-grained structural imaging data required for the interpretation of the functional data.

Once the neuroimaging experiments have been set up and initial fMRI data is available, we implant a recording/stimulation chamber that will allow us to target multiple specific brain regions with electrodes for stimulation and neurophysiological recording. The choice of these regions will depend on the results of the fMRI experiments, existing knowledge of psychiatric disorders and brain function, as well as practical considerations such as which brain areas can be reached from the recording/stimulation chamber(s). The animal will then perform cognitive tasks while we electrically stimulate relevant brain regions with a range of stimulation settings (e.g., frequency and amplitude). Outside the scanner, this will allow us to investigate if and how stimulation affects behavioural performance. Repeating this approach inside the scanner will furthermore reveal the brain-wide activity patterns associated with these stimulation effects. Recording neural activity allows investigation of the activity patterns associated with the cognitive tasks in the same structure, but with more detail, and will complement the fMRI recordings.

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

An overview of the procedures and the associated discomfort is presented in the flow chart

Acquisition and housing
Monkeys will be obtained from a licensed breeding facility. In all cases, we will first try to obtain our animals from a national primate centre. Only under exceptional circumstances (no monkeys available at

the primate centre) we will get them from a licensed importer. Monkeys will be housed in the primate facility of our institute. All animals are male and typically between 3-5 years of age when they arrive. This is the age at which young male monkeys typically leave their social group. We typically acquire two cage-mates together and these are then pair-housed for 3-4 weeks in a cage in isolation from the other monkeys (for quarantine reasons). When the results of viral and bacteriological tests are shown to be negative we can, if desired, pair these monkeys with established members of the group. We consult an ethologist from a national primate centre who advises us on appropriate pairings. This can be desirable to form stable pairings or larger groups (if social character of the animals allows it). Our facility contains large cages and the monkeys will have access to a floor-to-ceiling play cage, which allows them to climb and swing. The play cage also contains a 'look-out' platform where the monkeys can view other monkeys in the facility. The environment will be enriched with toys (e.g. boxes filled with nuts or sweets, which the monkeys can fiddle out) and access to natural daylight. A TV screen shall be running in front of the cages during the day. A logbook will be maintained individually for each of the monkeys, carefully monitoring their general appearance, their eating behaviour, weight, and the performance during the training sessions.

Acclimatization

Discomfort: Mild or none

The monkeys will be adapted to the animal housing facility and the staff. This includes but is not limited to an initial period in which the animal will be housed with a partner, will receive daily food treats from the staff, and will have access to toys in his cage and television. Previously acquired monkeys in the facility have successfully undergone this period of adaptation and interact well with the staff and do not exhibit signs of stress due to their environment. During this period, the monkey will receive a CT and MRI scan (see below). During one of these procedures the monkey will be fitted with a collar.

CT scanning

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia), once per animal (unless complications require re-assessment)

A CT scan may be obtained to allow 3D models of the monkey's skull to be constructed. These are used to custom design surgical implants which perfectly fit the skull of the animal. The monkey is anesthetized in its home cage, and then transferred to the CT scanner. The scanning procedure lasts less than 5 minutes. The monkey is then returned to his home-cage, and he is allowed to recover from anaesthesia. The total duration of the procedure is approximately 30 minutes. When there are no complications, this procedure will only take place once per animal. Occasionally, in the event that an implant comes loose, we may perform a further CT scan to assess the state of the underlying bone.

MRI scanning

Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia), once per animal (unless complications require re-assessment)

Structural MRI scans are obtained to check whether the brain has any anatomical anomalies, and to localize specific brain structures and plan surgical implants. The monkey is anesthetized in its home cage and then transferred to the MRI facility. The anatomical scan lasts approximately 15-20 minutes, after which the monkey is returned to his home-cage, and allowed to recover. If there are no complications, this procedure will only need to performed once per animal.

Chair training

Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.

The collar will be used to gently pull the monkey into the primate chair. Food and liquid rewards will be used in order to classically condition the monkey to enter the chair. Once learnt, the monkeys usually get into the primate chair voluntarily and rapidly. Once this behaviour is acquired, the animal will initially be rewarded with fruit or fruit juice for sitting quietly in the chair for short periods of time. The head of the monkey is not fixated at this stage. The time spent in the chair will gradually be increased as the animal becomes ever more comfortable and will be adjusted according to the animal's behavioural reaction.

Surgery: Head-post implantation
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.
All surgeries are performed in the purpose-built primate operation room within the primate facility of our institute. Specialist anaesthetic equipment is available and the surgeries are performed by trained staff. In order to head fix our monkeys during training, a head-post is attached to the skull. After induction of anaesthesia, an incision is made in the skin, and the skin is gently pulled aside, exposing the area of the skull above the cortex. The head-post is attached and the skin is sutured closed. Analgesics are given during the surgery. The duration of the procedure is approximately 1-2 hours.
At the end of the surgery, the animal is monitored and kept warm while waking up. Additional analgesics are given during the recovery period. Following the surgery, training will be discontinued for at least four weeks so that the animal may recuperate. During this time, the head-post will become solidly fixed to the animal's skull.

Head-fixation training
Discomfort: Mild (but decreasing after 1-2 times), approximately 1 week
The animal will receive food and juice rewards for sitting quietly in the chair with their head fixated via the implanted head-post. The amount of time spent fixated in the chair will increase progressively and will be modulated according to the behavioural reaction of the individual animal. Once the animal quietly sits in the chair with his head fixed for a sufficient period of time (0.5 hours), the animal will begin training on the basic experimental tasks. This step usually takes about a week, with the discomfort of the procedure being mild for the first one or two times that the animal is fixated, and lower after this.

Behavioural training on basic tasks
Discomfort: Mild
To motivate monkeys to perform their task, they are placed on a fluid control regime (described below). During training, the monkey is presented with sensory stimuli and responds with an eye movement and/or hand movement. We use positive reinforcement to train the animals, correct responses are followed by a fluid reward and the animals are allowed to work until satiated. The size of the reward is individually determined and is adapted throughout the training session to ensure that the monkeys remain motivated to work. No negative reinforcement is used, incorrect trials are typically followed by a lack of reward, and in some cases a small 'timeout' (5-10 s) may be given. As the monkeys learn the paradigm and their performance increases, we gradually make the task more challenging. Task difficulty is adjusted to ensure that the monkeys are able to obtain their full fluid ration during the training session. During the training periods, animals are typically in the setup 5 days per week, 1-4 h per day (typical is 2-3 h). Training on the initial tasks takes between 2-6 months depending on the monkey. An example of a training task is to have the monkey direct their gaze to a very small region of a computer screen for 1 s (known as 'fixation'). The difficulty of the task slowly increased by gradually decreasing the size of the area that the animal must fixate upon while slowly increasing the duration of the fixation. At the end of the training period the animal is expected to be able to fixate in a 1^0 diameter window for at least 400 ms and perform delayed saccade-tasks. A saccade is a very rapid eye-movement that monkeys and humans make approximately 3 times per second to direct the eyes to objects of interest. In a delayed-saccade task the animal must wait for a 'go' cue (e.g. the fixation dot changes colour) before making his eye movement. Most animals are also trained to make hand-movements in response to particular visual stimuli during the training period. The duration of this training period varies from 1 to 6 months depending on the aptitude of the monkey. In our experience, all monkeys are able to learn these tasks within 6 months.

Controlled fluid uptake
Discomfort: Mild, during all training and recording phases (up to 4.5 years, with breaks as outlined below)
To motivate the animals to work their access to fluid is controlled. The main reason why we use controlled fluid uptake is that we need to obtain a sufficiently large number of trials per session, for two reasons. First, we need reliable measures of the animals' perception of visual stimuli and the choice preference. Accurate measures of perception and of choice preference demand a large number of trials. Second, we obtain a larger number of trials to study the activity of neurons. The activity of neurons is inherently stochastic, i.e. the responses of a cell to repetitions of the same stimulus are variable, a

stochasticity that is inherent to proper brain function. Third, we need a sufficient number of trials to measure the effects of DBS on other brain structures. Controlled fluid access is by the far the most common method to motivate animals to perform cognitive tasks. We note that only healthy and cooperative monkeys that are at ease will perform these tasks in which they make eye or arm movements. Alternative methods have been explored as described by a workgroup for the British NC3R centre (National Centre for Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research) (Prescott et al., 2010). These alternatives comprise 1) positive reinforcement with fruit juice, without controlled fluid uptake; 2) food-based reinforcement; 3) electrical stimulation of reward centres in the brain. We use all three of these techniques, but none of them can replace controlled fluid uptake. Reinforcement with juice in the absence of controlled fluid uptake works well in the early stages of training when training sessions are short and tasks simple, but it is insufficient to motivate the animal to perform more difficult tasks or a larger number of trials. Food reinforcement with treats like raisins or peanuts is used in our lab to reward an animal for compliant behavior (for instance, for coming to the correct compartment of the cage to interact with a researcher). It can also be used as reinforcement for short and simple tasks at the start of training. However, animals satiate quickly when rewarded with food and chewing movements cause artefacts in our recordings, which makes this type of reinforcement unsuitable for sessions that require many trials and precise recording of neural activity. Electrical stimulation of reward centres (Bichot et al., 2011) is used as an experimental variable in this particular project and can therefore not also be used as a replacement for controlled fluid uptake.

Controlled fluid uptake is thus the only viable method available to obtain sufficient numbers of trials to be able to reliably measure behavior and neural activity. We implement controlled fluid uptake in a gradual fashion that adapts the level of fluid control to the behavior of each individual. We begin with positive reinforcement using fruit juice without any controlled fluid uptake. We only use fluid control regimes if the animal is not sufficiently motivated to perform the task with no fluid control. We gradually introduce the fluid control with the aim to have the animals drink as much fluid as possible and the fluid control is only made stronger if necessary. Nevertheless, in the majority of animals it is necessary to restrict access to fluid to some level to obtain enough trials on the complex behavioural tasks described in the application. Our aim is to allow the animal to drink fluid during performance on the cognitive task until they are satiated. This is achieved by:

- The difficulty of the task is adjusted on each day so that the animal is able to receive fluid at a high rate, motivating him to work for many trials, and drink enough fluid in total.
- The rate of fluid delivery is slowly increased during a training session to ensure that the animals drinks throughout the session.
- If the training session has to be aborted, for example due to a technical fault or non-cooperative behaviour of the animal, then the animal receives fluid equivalent to the average intake during a training session.
- We investigate the preferences of each animal for particular rewards e.g. apple juice, different types of fruit syrup, or water, and use a reward that is appealing to the animal

We take a number of measures to prevent dehydration:

- The monkeys always receive a minimum of 100 ml of fluid each day. If this amount is not reached during the training session, it is supplemented.
- Averaged over a three-day period, the animals must receive a minimum of 35 ml per kilogram metabolic weight per day, this number is based on recommendations by the British N3CR (National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research) and the primate facility of UC Davis. For example, a 10 kg animal must receive a minimum of: 100.75 x 35 = 197 ml of fluid per day, averaged over the previous three days. If this average is not achieved, the animal is supplemented with fluid. This is a minimum amount and the animals typically receive much more fluid than this.
- Fluid intake, both received during training and supplemented in the cage, is logged in an electronic system accessible by researchers, caretakers and inspectors.
- The animal is provided with fruit after the training session, the liquid content of the fruit is not counted towards the minimum amount.

- During breaks in the training schedule of more than two days the monkey receives a full water bottle of at least 700 ml, animals over 15 kg receive an extra bottle. If the break is only one day, then the animal receives an amount of fluid equal to what it would typically receive during a training session.
- While the animal is under fluid control the researchers and animal caretakers monitor its appearance and behaviour carefully every day, with checks by the animal caretakers during the weekend. We weigh the monkey before and after training and compare the weight to the average weight during the last week. The weight is also checked over longer intervals to prevent a slow loss of weight. We check the monkey for any signs of dehydration such as reduced skin tension, sunken eyes, either increased or reduced activity, dry faeces. If any of these welfare criteria is abnormal, the monkey is taken out of training and provided with ad libitum access to fluid until it has recovered. In that case, the Animal Welfare Body will be informed so that they can check the animal. These criteria (weight, fluid consumed per day) are logged in an electronic system for each monkey so that the history is accessible.
- The animal receives a non-working period once every 9 weeks (on average over a year). During this period (which lasts a minimum of one week) the animal is not trained and receives a full bottle each day (>700 ml).

The British NC3R centre investigated in 2010 the use of controlled fluid regimes in brain research with macaque monkeys (Prescott et al., 2010). Their conclusion was that, when a controlled-fluid protocol is carefully applied and monitored, there are no negative consequences for the health of the animal. Follow-up research from the University of Newcastle (Gray et al., 2016) showed that controlled fluid uptake for 7 days per week did not lead to abnormal blood values or signs of dehydration. Another study (Hage et al., 2014) analysed a broad range of behaviours over several months during fluid control and found no evidence for alterations in behavior, which indicates that the animals' wellbeing can be stably ensured during training sessions with a proper protocol. Indeed, from their general appearance, it is very difficult, if not impossible, to distinguish between monkeys under fluid control and monkeys with ad libitum access to water. Furthermore, the animals are seen regularly by a veterinarian to inspect their general condition, and we investigate measures of kidney function during the yearly check-ups. We have never obtained indications of impaired kidney function. Hence, our own experience is in accordance with the literature, which indicates that a careful protocol of controlled fluid uptake is a safe and effective manner to motivate animals to perform the required cognitive tasks. Considering the abovementioned precautions and proactive measures, the chances that we will encounter dehydration in one of our animals are practically zero.

The procedures described above are similar for all monkeys in our facility (although the type of head holder is different for animals assigned to MRI projects, since metals cannot be used). This means that sometimes re-use of animals from other studies will not be possible (see C).
The procedures below are specific for the current project.

Behavioural training on complex tasks
Discomfort: Mild, 1-5 times a week
Once the animals have completed their initial training, training will begin on more complex cognitive tasks. These tasks will comprise variants of a straightforward decision-making tasks, in which the animal chooses between visual targets by making an eye- or hand-movement. Different targets or target features could, for instance, be associated with different levels of reward. The rules that determine the amount of reward or the correct response can then be signalled by secondary cues and change over time to probe the animal's ability to adjust its behaviour to changing reward information. Such tasks are highly relevant for psychiatric disorders associated with problems in motivation or reward-processing. Depending on complexity, the animals are expected to learn new tasks in 1-6 months.

Structural neuroimaging under anaesthesia
Discomfort: Mild (recovering from brief anaesthesia), ~4-5 times per animal.
The mapping of functional imaging onto specific brain structures requires much more detailed structural brain information than can be obtained in the brief initial structural scan routinely performed with new animals and mentioned in the above. To obtain such information we need to employ slower scanning sequences, for which motion artefacts are primary concern. To this end, the monkey is anesthetized in its home cage and then transferred to the MRI facility. The anatomical scan lasts approximately an hour, after which the monkey is returned to his home-cage, and recovers. We expect to need approximately 4 or 5 of these imaging sessions per animal, the results of which can be averaged to reconstruct high-resolution 3D representation of an animal's individual neuroanatomy. Since anaesthesia is only used here to avoid motion, we will use a relatively low dose to minimize the discomfort associated with recovery.

Surgery: Recording chamber implantation
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 1 week.
A surgical procedure is carried out under general anaesthesia to implant up to two recording/stimulation chambers. The choice for one or two stimulation chambers depends on the brain areas we plan to stimulate based on neuroimaging results. If these areas can be reached from a single chamber we will only implant one. If, however, some areas require a significantly different point or angle of entry into the brain it is possible that they cannot be reached from the same chamber. In such cases, and if space permits, we will implant two chambers. If this requirement is known before the first chamber is implanted, both chambers will be implanted in the same procedure. In this initial procedure, the skull is left intact. An incision is made in the scalp and the skin is retracted. A recording chamber is placed in a location that allows access to the brain regions that will be targeted with stimulation. The animal receives appropriate analgesics during and after the procedure.

Cleaning recording chamber
Discomfort: none, 2-3 times a week
The recording chamber(s) must be cleaned every 2-3 days to prevent infection. The procedure takes place while the animal is sitting in the primate chair before or after a recording session. The chamber lid is removed and the interior of the chamber is flushed with anti-bacterial solutions such as chlorhexidine. Finally, the chamber is flushed with saline. The total duration of the cleaning procedure is around 5 minutes and it causes no discomfort.

Surgery: Craniotomy
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 1 week.
A surgical procedure is carried out under general anaesthesia to perform a craniotomy inside the recording chamber(s), allowing access to the underlying brain structures. The animal receives appropriate analgesics during and after the procedure. In some cases, it may be possible to combine the craniotomy procedure with the recording chamber implantation in a single procedure.

Awake neuroimaging/electrical stimulation/electrophysiological recording
Discomfort: Mild, 1-5 times a week for BOLD, 3-7 consecutive days for contrast-enhanced CBV (followed by 7 days of no contrast-agent).
The awake neuroimaging/electrical stimulation/electrophysiological recording sessions are similar to the behavioural training sessions, with the exception that the monkey is transported to the imaging facility in a closed off cart (~5 min) and either performs the task inside the real MRI scanner and/or the animal is connected to the stimulation/recording equipment. Both the electrical stimulation and the electrophysiological recordings require electrodes to be slowly lowered across the dura into the brain which may cause a brief moment of mild discomfort. If that occurs, we will use a low dose of local anaesthetic applied to the dura to prevent any discomfort. In MRI-scanning sessions the monkeys may experience mild discomfort from the loud scanner noise, even though they have been exposed to it during training and we give them earplugs. In our experience, the animals do not show any signs of distress in response to scanner noise. The duration of each session will be between 1-4 hours (typically 2-3). Animals are generally either in a recording session or being trained (on a new task, or to maintain performance on 'known' tasks) 5 days a week.

In practice, scanning sessions in which BOLD signals are measured will usually be done no more than 4 times a week (due to scanner availability). Scanning sessions in which CBV signals (higher signal-to-noise-ratio than BOLD) are measured by use of the injection of an iron-oxide contrast-agent (maximally 12 mg/kg) will preferably be clustered in 3-7 consecutive days, followed by at least 7 days in which no contrast-agent is given. This is because the half-life of the contrast agent in monkeys is approximately 15h. Consequently, the required dosage for injection becomes progressively lower when we image on consecutive days. Due to this accumulation, we will also inject the animals with an iron chelating agent afterwards (4-6 days) to help reduce plasma iron levels back to normal. Electrophysiological recording sessions can be performed in the training set-up (no MRI scanner needed), which is available 1-5 days a week.

It is difficult to precisely estimate the relative frequencies of training sessions, BOLD-imaging sessions, CBV-imaging sessions, and electrophysiological recording sessions, because this will depend on animal performance, scanner availability, and initial results. As a general guide, we can say that we will start a scanning project with BOLD-imaging sessions to get some initial results and verify whether everything works as planned. If initial results, animal performance, and scanner availability allow it, we will perform sets of CBV-imaging sessions (as described above) to obtain higher quality data. Due to its higher signal-to-noise-ratio, we estimate that CBV-imaging allows roughly a threefold reduction in the number of imaging sessions compared to BOLD-imaging. It is furthermore expected that about 30-40% of sessions will be training sessions to maintain or improve cognitive behaviour on the tasks. In such sessions, the animal is not scanned and no electrode penetrations are made.

The total duration of the recording (and training) sessions will be between 6 months and 4 years.

Removing tissue above the dura
Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia), once every 1-3 months after craniotomy.
It is sometimes necessary to remove tissue that has grown over the dura within a recording chamber to improve the ease with which electrodes can be moved into the brain. The monkey is lightly anesthetized and the tissue is removed with a specially designed tool. The amount of tissue damage caused by this procedure is minimal and the monkey recovers within an hour after cessation of the anaesthesia. The monkey receives analgesics during the procedure.

Surgery: Restorative surgeries
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.
In rare cases an implant (head-post or recording chamber) may become loose. A repair surgery is then performed to prevent failure of the implant. The repair surgery is performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. The nature and duration of the repair surgery depends upon the type of implant and the extent of the problem. An individual monkey can undergo a maximum of two restorative surgeries per implant during the course of these procedures. With the maximum possible number of two recording chambers and a headpost this could result in maximally 6 procedures. Repair surgery will always be performed in consultation with the Animal Welfare Body (IvD) and (if necessary) the veterinarian.

Surgery: Implant removal
Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.
Monkeys that have reached the end of the experiment and that will not be re-used in other experiments or euthanized are sometimes kept at the institute because of social bonds that the monkeys have formed with other animals, or because they are particularly social animals that are useful for acclimatizing young animals. It may also be possible to send animals to a primate refuge (see NCad advice "Rehoming of former laboratory animals"). In these cases, the implants are removed in a further operation under general anaesthesia with appropriate analgesia. Recording chambers and head-posts can usually be removed in a single procedure. The skin is re-sutured over the location of the implant and in our experience the animals recover fully from the procedure.

Perfusion
Discomfort: Mild or none.
If histological analysis needs to be performed to verify the location of electrodes, then the monkey will be euthanized at the end of the experiment. The animals are euthanized by an overdose of barbiturates. In cases where the brain will be used for further anatomical or histological studies, the monkeys are cardially perfused with fixative.

Annual health-check
Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia).
Once per year, each animal in our facility is checked by the veterinarian to assess their general health and appearance and to take blood/urine samples for further testing. In this way, the long-term health of the animals is closely monitored. The animal is lightly anesthetized during this procedure which takes 10-15 minutes per animal.

References

Bichot, N.P., Heard, M.T., Desimone, R., 2011. Stimulation of the nucleus accumbens as behavioral reward in awake behaving monkeys. J. Neurosci. Methods 199, 265–272.
Hage, S.R., Ott, T., Eiselt, A.-K., Jacob, S.N. & Nieder, A. 2014. Ethograms indicate stable well-being during prolonged training phases in rhesus monkeys used in neurophysiological research. Lab. Anim. 48, 82–87.
Prescott M.J., Brown V.J., Flecknell P.A., Gaffan D, Garrod K, et al., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. J. Neurosci. Methods 193, 167–88
University of California Davis, 2001. Policy statement: water restriction in rhesus behaviour studies. UC Davis Office of Environmental Health and Safety.
Gray et al., 2016. Physiological, Behavioral, and Scientific Impact of Different Fluid Control Protocols in the Rhesus Macaque (Macaca mulatta). eNeuro 3(4).

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

These experiments investigate the effect of electrical stimulation of different brain regions on both global brain patterns and cognitive behaviour. In neurophysiological primate research, the absolute minimum number of animals that can be used to check for consistency across animals is two, which is also the broadly accepted norm. Statistics in such studies are however typically performed across neurons or electrical stimulation sites, a level of detail that is far beyond the resolution of fMRI. In human fMRI studies, a typical project will comprise >10 participants that are each scanned only once or twice. In monkey fMRI, ethical considerations and training investments typically dictate that an experiment is performed in 2-5 animals, each of which is scanned multiple times to obtain reliable results over sessions.

We estimate that to obtain reliable results with a range of stimulation targets, we will need data from at least four animals, due to the expected variability in cognitive behaviour, anatomical accessibility of stimulation targets and imaging results. We thus initially apply for a minimum of four animals. However, because the real variability in results across animals in these experiments is not yet known, this project may require measurement in an additional animal. In addition, although we have good experience with most of our monkeys, some individual circumstances may preclude a monkey from being used for a specific experiment (e.g., if he is not able to learn a behavioural task). If and when such cases arise, we will apply for an additional animal with the Institute's IvD.

B. The animals

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

Species used:
We will use rhesus macaque monkeys (Macaca mulatta) in these experiments. All monkeys are obtained from a national primate centre, or in exceptional circumstances (i.e. if no animals are available from the primate center) from a licensed importer. Monkeys are typically acquired aged 3 years or older. The main

aim of this application is to understand how deep brain stimulation (DBS) of subcortical structure influences cognitive functions to potentially relieve psychiatric symptoms. This approach requires a species with comparable neuroanatomy to the human and the ability to perform cognitive tasks that are relevant to the psychiatric symptoms for which these patients are typically treated. In rodents, the nodes of the relevant neural circuits although similarly interconnected, are differently located relative to each other. In addition, they have much smaller brains and their frontal cortex is far less developed, which makes it difficult to translate distal stimulation effects to the scale of the human brain. While certain aspects of the neurobiology of psychiatric disorders and their interaction with DBS can be studied in rodents, the cognitive and brain-wide consequences of clinically relevant DBS cannot. We collaborate with a group in our institute that takes this approach in rodents and discuss experimental designs and results. These regular meetings which include clinicians, the rodent research group, and the monkey research group constitute a unique research environment and allows us to optimize our research for clinical relevance. Larger animals such as pigs might be similar to humans in terms of brain size, but not in terms of functional neuroanatomy or their capacity to perform complex cognitive visual tasks. Only primates such as macaques fulfil both the neuroanatomy and cognition requirements. The experiments are invasive as they require the implantation of a head-post and further surgical implantations to allow stimulation electrodes to enter the brain. These experiments can therefore not be performed in humans. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available. Furthermore, we will be able to benefit from the vast amount of existing (neuroscience) literature on macaque monkeys, and relate our findings to previous work.

Sex used:
We exclusively use male monkeys in these studies. Our facility houses only male monkeys as males adapt better to living in paired social housing than females and there are no possible complications with breeding that would be present with female animals. The choice for males will not affect the results of the study as it is unlikely that there are differences between the sexes in how DBS affects brain activity and basic cognitive behavior. Males are therefore chosen to allow us to maintain 100% male animals in our facility.

Animal number:
Given the novelty of the proposed experiments it remains hard to estimate the individual variability that we will encounter. However, we estimate that to obtain reliable results with a range of stimulation targets, we will need data from at least four animals due to the expected variability in behaviour, anatomy and imaging results. While neurophysiological studies with non-human primates commonly comprise only two animals, data in these experiments is usually obtained from a large number of individual neurons or recording electrodes (for instance on a Utah array). This is a level of detail that is inaccessible to fMRI. Human neuroimaging studies generally include 10-20 participants that are scanned once or twice. Monkey neuroimaging studies, on the other hand, usually report results from between 2 and 5 animals that are each scanned numerous times to obtain reliable results. Several recent monkey fMRI studies investigating global brain networks (Ortiz-Rios, et al. 2017; Sliwa & Freiwald, 2017), reward processing (Chau, et al. 2015), and microstimulation effects (Petkov et al., 2015) all report results from four animals. Even though the novelty of our study makes it difficult to predict variability and effect sizes, we estimate that we will be able to obtain reliable results with four animals as well.

In addition, it could still be possible that results from these animals is contradictory, or that ethical considerations (humane endpoint) require the termination of an animal. In such cases, the acquisition of data from an additional animal may be required. We have examined the use of monkeys in our lab over the past 10 years and found that in 4 out of 18 electrophysiology projects an additional monkey was required (22% chance). It remains difficult to estimate whether these odds will be similar for neuroimaging studies, but we have no a priori reason to expect them to be any different. If and when we deem the acquisition of an additional animal necessary, we will consult with the institute's Animal Welfare Body (IvD) and apply for formal permission.

This research project thus requires a minimum of 4 animals with the possible addition of 1 additional animal in the case of inconsistent results or problems with one of the 'original' animals. Moreover, 2 animals are already involved in related projects under previous licenses (see section 3.4.3 of the project

proposal). They are included in the total number of animals requested here. After a license for this project has been obtained, all proposed experiments will formally be executed under the new license. These 2 animals will then be transferred to this license and new study protocols will be submitted to the IvD.

References

Chau BKH, Sallet J, Papageorgiou GK, Noonan MP, Bell AH, Walton ME, & Rushworth MFS. (2015). Contrasting Roles for Orbitofrontal Cortex and Amygdala in Credit Assignment and Learning in Macaques. Neuron, 87(5), 1106–1118.

Ortiz-Rios M, Azevedo FAC, Kuśmierek P, Balla DZ, Munk MH, Keliris GA, et al. (2017). Widespread and Opponent fMRI Signals Represent Sound Location in Macaque Auditory Cortex. Neuron, 93(4), 971–983.e4.

Petkov CI, Kikuchi Y, Milne AE, Mishkin M, Rauschecker JP, & Logothetis NK (2015). Different forms of effective connectivity in primate frontotemporal pathways. Nature Communications, 6, 6000.

Sliwa J, & Freiwald WA (2017). A dedicated network for social interaction processing in the primate brain. Science, 356(6339), 745–749.

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.

Once an animal is implanted with MRI-compatible implants, it can participate in neuroimaging projects in later experiments. After the experiments of this procedure, the animals can be retrained to perform additional cognitive tasks. In addition, it may sometimes be possible to transfer an animal to another CCD project where either existing implants are continued to be used, or it might receive additional implants. In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives no more than two intracranial implants in total (headposts are not considered intracranial implants) and has *not* undergone serious discomfort. This means, for instance, that if a monkey has already been implanted with the maximum number of two recording chambers in this project, it will not receive any additional intracranial implants. Similarly, animals from other CCD projects could potentially be re-used in this project, provided that their existing implants are MRI-compatible. Again, an individual animal will never receive more than two intracranial implants (including implants from previous projects) and won't be re-used if it has already experienced serious discomfort. Re-use is preferable to the acquisition and training of a new animal as it leads to a reduction in the total number of animals.

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.

n.a.

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 main aim of this application is to understand how deep brain stimulation (DBS) of subcortical structures influences cognitive functions and activity in other brain regions. Patients that are implanted with clinical DBS systems have their electrodes in a fixed location, which precludes systematic investigation of different stimulation targets. Furthermore, clinical DBS systems cannot be active inside the strong magnetic field of the MRI environment (some hospitals will not even scan patients with a DBS system that is switched off) which means that direct effects of stimulation cannot be recorded. This approach thus requires an animal model with comparable neuroanatomy to humans treated with DBS and the ability to perform cognitive tasks that are relevant to the psychiatric symptoms for which DBS patients are typically treated. Only primates such as macaques fulfil both these requirements. Given these considerations, no alternative to the macaque monkey is available.

Reduction
The number of animals we want to use is the minimum number with which reliable results can be obtained, and no further reduction is possible. If possible, we will re-use the animals used in this procedure in further experiments leading to a reduction in the total number of animals used.

Refinement
All procedures (including housing) are refined to minimise discomfort for the animals as much as possible, using the latest knowledge and techniques in animal welfare. We take several measures to refine our experiments. First, we decrease the amount of stress by gradually introducing all aspects of the behavioural tasks, and careful conditioning of the monkeys to any novel aspects of our behavioural experiments. Second, we implement an elaborate set of measures (described above) to prevent adverse effects of the controlled fluid uptake. Third, all surgeries will be carried out by persons who are well trained. Fourth, we use antagonist to minimize the discomfort of recovering from anaesthesia. Fifth, animals are housed socially in an enriched environment in order to keep them engaged, reduce the discomfort of living in a cage, and improve their cognitive abilities.

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

During surgeries, analgesics and anaesthesia are used to minimize pain and suffering. Breathing and temperature will be registered and level of anaesthesia and warmth of heating-pad will be adjusted as such. Post-surgical analgesics will be administered and animals will be kept on a warm blanket or under a warm lamp until they wake up. Food and fluids are placed in the home cage to facilitate easy access to food and water. They will be allowed to recover for several weeks following surgery. During a recovery period of at least 7 days post-surgery, behaviour, wound area, and appearance will be monitored daily. In this period, additional analgesics and antibiotics are given to minimize discomfort and the risk for infections.

We constantly monitor the welfare of trained animals, assessing their appearance and behaviour every weekday, with checks by the animal caretakers during the weekend. During periods of behavioural training the animals are weighed daily and all details concerning weight, appearance, fluid intake and any irregularities are recorded in an electronic database which can be viewed by researchers, caretakers and inspectors.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The proposed experiments are novel and an important step towards promoting DBS as a precise knowledge-driven treatment option in psychiatry. The applicants are very familiar with the research literature and the present set of experiments are ground-breaking and have not been performed previously. The research described here is not legally required.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☐ No

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

Monkeys will be housed solitarily for several days following an implantation surgery, to ensure full rest and recovery. The cage environment will be enriched by bedding material, swings, toys, and treats. We will monitor their weight and appearance on a daily basis.

Their fluid uptake will be controlled. The measures we take to reduce adverse effects of restricted fluid

uptake have been described above.

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.

During surgery, anaesthesia and analgesia will be applied as described above. Also, post-surgery analgesics will be administered.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. Infections: There is a rare possibility of infection around the wound area. In these cases, we will apply additional analgesics and/or antibiotics. Visible signs of microbial infection will be monitored. The following will be considered as signs of an unhealthy state of the animal: (a) aberrant behaviour; (b) dehydration; (c) weight loss.

2. Wounds as a result of fighting with other animals: the social housing structure in the animals' home-cage environment is carefully determined (together with experts in macaque behaviour) and closely monitored. However, fights do sometimes occur between animals to assert dominance, either between cage-mates or between animals in neighbouring cages. These fights usually don't cause any, or only minor superficial, damage, but sometimes it may be necessary to clean a wound and stitch it up. We do believe, however, that the benefit of social housing outweighs the discomfort associated with such occasional fights.

3. The occurrence of weight loss due to the controlled fluid uptake and the measures that we take to prevent dehydration have been described above.

4. Insufficient recovery after surgery: applicable if an animal shows permanent weight loss (more than 15%-20% of the weight immediately after surgery for more than 10 days). This occurs infrequently (<2%).

5. Loosening of an implant.

6. Brain swelling during operations.

7. Seizures. In very rare cases it may be possible an animal suffers from a seizure, this may be due to brain-swelling after an operation or a side-effect of an infection.

8. Sub-dural bleeding. During operations or electrode penetrations it can occur that a blood-vessel is damaged. Small bleeds typically cease within minutes with no ill effects. Very rarely the bleed may be

larger leading to neurological symptoms. These typically disappear within a few days. In the case of persistent severe neurological symptoms, the animal is euthanized.

Explain why these effects may emerge.

Surgical implantation of cranial and brain implants is accompanied by risk of microbial infection, tissue rejection, or unwanted growth of granulation tissue that prevents the implant from integrating with the body. The causes of the other adverse effects are described above.

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

1. We constantly monitor the animal's behaviour, liquid intake, wound area, and physiology. Surgeries are performed under sterile conditions and without any unnecessary delays to minimize the amount of time the animal spends under anaesthesia. Animals will be monitored daily and if adverse effects are present, this will be discussed with the veterinary officer. If necessary, treatment will be initiated (topically or systemically applied medication). Interfaces between biological tissue and implants are cleaned regularly to and recording chambers cleaned every few days to minimize the risk for infection.

2. The social housing structure in the animals' home-cage environment is carefully determined (together with experts in macaque behaviour) and closely monitored. Cage-mates are matched based on age (difference), physical appearance and character to avoid ambiguous dominance structures as much as possible. Social structure, however, is a dynamic feature and changes in dominance do occur over time, for instance with aging. When problems start to arise we re-assess the situation and if necessary change the social housing structure.

3. The measures to prevent dehydration due to controlled fluid uptake have been described above.

4. We monitor animals carefully after surgery. They are placed under heat-lamps during recovery and given post-operative analgesics. Food and water are freely available in the home-cage. The animals are temporarily housed alone after the surgery to allow proper recovery. All animals are checked once per year by the veterinarian to monitor their long-term health.

5. Over the years we have made several refinements to our cranial implants and we continuously review and refine the design of our implants. In the unlikely event that a head post or recording chamber becomes loose or detached, the animal is closely inspected, and may undergo a CT scan to allow us to assess the condition of the bone. If an implant becomes loose/detached from the skull, we reattach the implant in a repair surgery. The repair surgery is performed under anaesthesia and with analgesia in an identical fashion to the original attachment surgery. We estimate the discomfort to be moderate during recovery from the anaesthesia (1 day) becoming mild for 1-2 days. In rare cases (once in the past 10 years), the skull becomes infected, causing moderate discomfort. In these cases, the monkey is immediately euthanized under anaesthesia. We minimize the occurrence of headpost failures by slowly adapting the monkey to being head-fixed in the set-up so that it is relaxed and does not exert strong forces on the headpost while fixed in the setup.

6. To combat the possibility of brain-swelling, we always give pre-, peri- and post-operative corticosteroids for operations in which the skull is opened and, if indicated, we give intravenous mannitol.

7. If the animal suffers a seizure, anti-seizure medication is given immediately and the underlying cause is treated, e.g. with high-dose corticosteroids or antibiotics. The veterinarian is informed.

8. All operations are performed as precisely as possible by trained 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.

Each animal that undergoes surgery will be monitored for clinical parameters. The monkey will be monitored for its general appearance and activity level. If a monkey has an appearance that gives cause for concern (e.g., signs of infection around the wound, weight loss, or reduction in activity level), we will notify the IvD and evaluate the animal together with the veterinarian. Similarly, if the animal does not recover well from anaesthesia we will evaluate the animal together with the veterinarian.

In addition, the weight of the animal will be monitored and if the animal loses 10-15% of their weight in 2 consecutive days or if the animal loses more than 20% of their weight throughout the course of the experiment then the veterinarian will be contacted and a decision will be made whether a humane endpoint has been reached.

If a cranial implant breaks off and infection or severe damage to the skull is sustained, the monkey will be immediately euthanized.

Indicate the likely incidence.

Humane endpoints are expected to be met in 0-5% of the animals tested within the time frame of the experiments.

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').

Acclimatization
Discomfort: Mild or none
CT scanning
Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)
MRI scanning (initial)
Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)
Chair training
Discomfort: Moderate the first 1-2 times, none after this.
The animal experiences some stress the first one or two times, but they very quickly learn to associate the chair with rewards and voluntarily enter the chair after this phase.
Surgery: Head-post implantation
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 2-3 days.
Head-fixation training
Discomfort: Mild (but decreasing after 1-2 times)
Behavioural training on basic tasks
Discomfort: Mild
Controlled fluid uptake
Discomfort: Mild
Behavioural training on complex tasks
Discomfort: Mild
Structural neuroimaging under anaesthesia
Discomfort: Mild (recovering from brief anaesthesia)
Surgery: Recording chamber implantation
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 1 week.
Cleaning recording chamber
Discomfort: none
Surgery: Craniotomy
Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 1 week.
Head-fixation training
Discomfort: Mild
Monkeys very quickly adapt to head-fixation.
Awake neuroimaging/electrical stimulation/electrophysiological recording
Discomfort: Mild

At this point the animals are cooperative and experience no discomfort from performing the tasks. They may experience brief mild discomfort from entering electrodes through the dura in stimulation and electrophysiological recording sessions, and/or the injection of contrast-agent and iron-chelating substances in CBV-imaging sessions. Scanner noise could potentially cause mild discomfort as well, but in our experience the monkeys are not bothered by it much. Being head-fixed for several hours might also cause mild discomfort, but the animals are gradually accustomed to this experience and generally remain either cooperative (performing their task) or fall asleep.

Removing tissue above the dura
Discomfort: Moderate for 1 day (recovery from anaesthesia)
Surgery: Restorative surgeries

Discomfort: Moderate for 1-2 days, becoming mild for 3-4 days.
Restorative surgeries cause considerably less discomfort than the original implantation surgery as there is no need to cut through the skin and muscle tissue, which have already been removed during the original implantation. Hence, the overall tissue damage is minimal and the animals recover rapidly. The surgery and recovery from surgery is classified as moderate discomfort (for 1-2 days), becoming mild (for 3-4 days). There is a maximum of two restorative surgeries per implant.
Surgery: Implant removal
Discomfort: Moderate for 1 day, becoming mild for 1-2 days.
Perfusion
Discomfort: Mild or none
Annual health check
Discomfort: Mild (recovery from brief anaesthesia)

Cumulative discomfort
The monkeys in this protocol will experience moderate discomfort for short periods following surgeries. All surgeries are performed under general anaesthesia with appropriate analgesia. We use advanced anaesthetic approaches in which an antagonist to the anaesthetic agent is given at the end of the surgery. This leads to very fast recovery times compared to more traditional anaesthetics meaning that the discomfort associated with these surgeries is at the lower end of moderate. We nevertheless ensure that the animals receive long recovery times of at least 3 weeks after implantation surgeries. The animals also experience mild discomfort for longer periods of time related to controlled fluid uptake and procedures associated with the recording sessions. We take several measures to maximise the amount of fluid received by the animals and we provide breaks in the controlled fluid uptake regime to keep this discomfort to a minimum. Given these considerations we estimate the cumulative discomfort to be moderate.

We base this estimation on a report of the Animal Procedures Committee who were instructed to address the question of cumulative discomfort in primate research by the UK government (Pickard, 2013). This report indicates that there is no evidence for an accumulation of discomfort above the discomfort of individual procedures. We take several measures to ensure that accumulated discomfort does not exceed the moderate level. We use long recovery times between surgeries to ensure that the animals have fully recovered before additional interventions take place. Animals are housed in a high standard social environment with natural daylight and enrichment to facilitate natural behaviours like grooming, climbing, or foraging. Our controlled fluid protocol employs the mildest form of fluid control necessary to achieve the desired performance of the animal. The monkeys always receive water on each day as well as fruit (the liquid content of the fruit is not counted towards the total fluid amount) and the amount of fluid drunk by the animal is recorded in an electronic data-base. Previous studies of controlled fluid uptake by the N3CR centre in the UK have found that there are no long-lasting effects of fluid control on the health of the animal (Prescott et al., 2010). Finally, we continuously monitor each animal's health and behavior in an electronic database, together with its weight and food and fluid intake. Although the behavior of animals that participate in these experiments is virtually indistinguishable from the behavior of animals that do not, we will also obtain the opinion of an expert monkey ethologist on a regular basis to exclude psychological discomfort. If there is a threat that the future discomfort level of an individual animal might exceed moderate (for medical or psychological/ethologic reasons), the animal will be euthanized (humane endpoint) thereby excluding the possibility of severe discomfort. Given these considerations we estimate the cumulative level of discomfort experienced by the animals to be moderate.
In the case of re-use, all discomfort experienced in a previous project is inherited by the current protocol and will be part of an animal's cumulative discomfort.

References
Pickard, J., 2013. Animal procedures committee of the UK, Review of the assessment of cumulative severity and lifetime experience in non-human primates used in neuroscience research, https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/261687/cs_nhp_review_FINAL_2013_corrected.pdf
Prescott, M.J., Brown, V.J., Flecknell, P.A., Gaffan, D., Garrod, K., Lemon, R.N., Parker, A.J., Ryder, K., Schultz, W., Scott, L., Watson, J., Whitfield, L., 2010. Refinement of the use of food and fluid control as motivational tools for macaques used in behavioural neuroscience research: Report of a Working Group of the NC3Rs. J. Neurosci. Methods 193, 167–188.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☒ No

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

The monkeys will be euthanized so that we can obtain anatomical data regarding the price location of electrodes and the potential impact of electrical stimulation on the tissue. We will examine both macroscopic anatomical changes and microscopic changes using histological techniques. The monkeys will be cardially perfused with fixative under deep barbiturate anaesthesia

In cases where such detailed anatomical information is not required, for instance if we have obtained sufficient information from an initial number of animals, it may be possible for the animals to continue living as normal in their home cage or at a primate refuge. In these cases, the surgical implants are removed in a further operation. It is also possible that animals could be reused in other studies prior to being euthanized or 'retired'. (see section C. Re-use)

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

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

☒ Yes

Format Versie 10 februari 2017
Datum: maandag 7 augustus 2017

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: [redacted] 2017 2425

2. Titel van het project: Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry

3. Titel van de NTS: Cognitieve effecten van diepe hersenstimulatie in het kader van de behandeling van psychiatrische aandoeningen.

4. Type aanvraag:
   - ■ nieuwe aanvraag projectvergunning
   - □ wijziging van vergunning met nummer

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ■ ontvangen door DEC: 14-06-2017
   - ■ aanvraag compleet: 07-08-2017
   - ■ in vergadering besproken: 22-06-2017 en 27-07-2017
   - ■ anderszins behandeld: niet van toepassing
   - ■ termijnonderbreking(en) van 26-06-2017 tot 21-07-2017 en 05-08-2017 tot 07-08-2017
   - ■ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: niet van toepassing
   - ■ aanpassing aanvraag: finale herziene versie ontvangen op 05-08-2017
   - ■ advies aan CCD: 07-08-2017

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
   De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat de aanvraag de instemming heeft van de [redacted].

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:
   - Datum: 22-06-2017
   - Plaats: [redacted]
   - Aantal aanwezige DEC-leden: 5
   - Aanwezige (namens) aanvrager: de medeaanvrager
   - Gestelde vraag / vragen: de tijdens het horen van de aanvrager mondeling gestelde vragen zijn later tevens schriftelijk aan de aanvrager gestuurd zie punt 9
   - Verstrekt(e) antwoord(en): zie punt vraag 9
   - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag wel; zie onder vraag 9

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum brief van de DEC: 26-06-2017 en 05-08-2017

Gestelde vragen (samenvatting) 26-06-2017:
Aantal dieren
Er wordt een aantal van vier apen aangevraagd plus twee extra dieren. Een solide motivatie t.a.v. de twee extra dieren ontbreekt echter. Mondeling is toegelicht dat de extra apen pas worden ingezet op het moment dat een (of meer) van de apen problemen heeft met het leren van de taken of andere onvoorziene situaties. In de aanvraag dient duidelijk omschreven te worden onder welke omstandigheden de extra apen zullen worden ingezet. Het is evenmin duidelijk op welk moment de extra apen erbij komen. Meteen al of pas wanneer de uitval plaatsvindt?

Er is informatie verstrekt dat de kans voor de noodzakelijkheid van een extra dier ongeveer 20% is; dat zou betekenen dat er een kleine kans is dat 1 extra dier nodig is maar de kans op 2 extra dieren eigenlijk te verwaarlozen is. De onderzoekers wordt gevraagd om de onderbouwing van de extra dieren opnieuw te bezien en te overwegen om 1 en niet 2 extra dieren aan te vragen.

Vergelijkbaar onderzoek elders
De commissie wil duidelijk hebben wat dit onderzoek toevoegt aan vergelijkbaar onderzoek dat elders (België, VS) wordt uitgevoerd. In hoeverre is het uniek? Is er ook sprake van samenwerking met deze buitenlandse onderzoeksgroepen? En hoe zit het met relevant knaagdieronderzoek (zoals ook uitgevoerd op het eigen Instituut)? De uniciteit moet duidelijk zijn omdat dit een belangrijk aspect is voor de afweging.

Relevantie van het onderzoek voor patiënten
Er wordt in de aanvraag gesteld dat het voorgestelde cognitieonderzoek van belang is voor de behandeling van depressieve patiënten. De DEC wil dat deze bewering beter wordt beargumenteerd door de interactie tussen de kliniek en het voorgestelde onderzoek in apen duidelijker te schetsen. In de aanvraag wordt de samenwerking met de klinische afdeling van het academisch ziekenhuis niet vermeld. De adviseert de geformaliseerde samenwerking te noemen in de aanvraag, te meer daar de vraag naar het onderzoek (ook) vanuit de kliniek komt.

Wat doet de kliniek – en wat is de toegevoegde waarde van het dierexperimenteel onderzoek?
Gerelateerd aan bovenstaande vraag. De DEC mist in de aanvraag de stand van zaken binnen de kliniek; daar wordt men geconfronteerd met een therapie die soms wel en soms niet werkt. Wat zijn de ideeën over de redenen waarom het soms niet succesvol is. Wat doet men in de kliniek om het slagingspercentage te verhogen?

In de kliniek worden volgens de presentatie ook gedragstesten met patiënten gedaan; dat is waarschijnlijk met het doel om de selectie van het targetgebied te verbeteren? Geeft deze aanpak enige vooruitgang en is die vooruitgang wellicht dusdanig dat het onderzoek in de apen eigenlijk niet nodig is?

Is wellicht te stellen dat er in de kliniek sprake is van een stagnatie in het verbeteren van de DBS therapie? De vraag is dan wat het apenonderzoek dan gaat toevoegen t.o.v. het humane onderzoek om die stagnatie te doorbreken?

Readout
Uit de presentatie op de vergadering is duidelijk geworden dat in de kliniek er op uitgebreide schaal gedragsonderzoek wordt gedaan aan de patiënten om zo patiënten met ogenschijnlijk dezelfde klachten toch te kunnen onderscheiden. De patiëntenpopulatie heeft een breed spectrum en vereist een zeer precieze keuze van het DBS targetgebied. De gebruikte taken zijn gericht op beloning en impulscontrole. De huidige DBS targets spelen een rol in deze gedragingen. Het idee is dat patiënten anders (afwijkend) functioneren op het gebied van impulsiviteit en reward omdat de activiteit in deze circuits zijn verstoord en dat DBS de normale activiteit herstelt. Het brein van apen en mensen komt in grote mate overeen; niet alleen anatomisch maar ook wat betreft de effecten op het gedrag/gedragstaken bij stimulatie van specifieke targets. Het verschil is echter dat in de apen de stimulatie juist wordt gegeven in een normaal functionerend circuit met de verwachting dat de uitvoering van de taak zal worden beïnvloed. De situaties in de aap en de patiënt zijn daarom niet volledig vergelijkbaar; in hoeverre is zijn de gegevens verkregen uit de aap te transleren naar het afwijkende circuit van de patiënt? De DEC ziet graag een visie op dit punt in de aanvraag terug.

Herhaalde plaatsing elektrodes
In het antwoord op vraag 3.1 van de NTS wordt gesproken over plaatsverandering van de stimulatie-elektrodes. Deze handeling is één van de redenen waarom dit onderzoek niet in mensen kan worden gedaan dus het is van belang om in de aanvraag helder te presenteren wat deze handelingen inhouden.
De onderzoekers wordt verzocht aan te geven hoe vaak de veranderingen optreden en hoe het precies in zijn werk gaat (verandering in diepte – verandering van positie in het horizontale vlak?). En ook of er dan sprake is van plaatsing van een telkens een nieuwe elektrode (welke diameter heeft de elektrode?)? Treedt er schade op aan het weefsel? Plaatsen en het verplaatsen vindt plaats onder narcose?

fMRI
Wat zijn de gevolgen van het hebben van elektrodes in de hersenen voor de metingen in de fMRI? Patiënten met DBS kunnen niet in de scanner maar welke maatregelen neem je zodat de apen wel in de fMRI kunnen? Welke risico's lopen DBS patiënten in de scanner?
En wat is het belang van het MRI onderzoek? Zijn er alternatieven?

Hergebruik
Binnen het huidige project zal een dier maximaal twee implantaten krijgen. De DEC gaat ervan uit dat dit niet betekent dat als een tweede implantaat is verwijderd het dier niet nog een nieuw implantaat kan krijgen. Dit graag helder formuleren.

De voorwaarden voor de instroom vanuit andere projecten zijn niet voldoende duidelijk (re-use). De DEC gaat er vanuit dat ook voor de re-use dieren er een maximum van twee implantaten is met inachtneming van het voortraject van de dieren. Graag heldere criteria met eventueel met voorbeeldscenario's van wanneer wel en wanneer niet.

Cumulatief ongerief
Het cumulatief ongerief wordt als matig ingeschat. De inschatting is complex omdat er vele ongeriefsfacetten zijn in een langdurig traject. Terecht wordt onder K een lange lijst opgevoerd, maar het re-use scenario ontbreekt daarin. Over de inschatting in geval van re-use moet een tekst worden toegevoegd.
De DEC adviseert ook om de publicatie "REVIEW OF THE ASSESSMENT OF CUMULATIVE SEVERITY AND LIFETIME EXPERIENCE IN NON--HUMAN PRIMATES USED IN NEUROSCIENCE RESEARCH" te bekijken op voor dit project relevante onderdelen.

Stand van zaken m.b.t. de huidige apen
De DEC adviseert om in de aanvraag de stand van zaken m.b.t. de huidige twee apen te schetsen; dit geeft een reëel beeld van de aanvraag in de praktijk en het kan bijdragen aan de inschatting van de haalbaarheid.

- Datum antwoord: 21-07-2017
- Verstrekt(e) antwoord(en): De aanvrager heeft in de herziene versie de aanvraag gecomplementeerd op bovenstaande punten en de gevraagde aanpassingen doorgevoerd. Het aantal gevraagde dieren is verlaagd naar 5. De aanvrager heeft ook informatie toegevoegd over de keuze van vochtdeprivatie en het cumulatieve ongerief; dit n.a.v. door de CCD gestelde vragen in het kader van een eerdere aanvraag.

Gestelde vragen (samenvatting) n.a.v.tweede DEC meeting: brief van 02-08-2017 en antwoord op 05-08-2017;

- *Telt de cranial implant mee in het maximum aantal van twee implantaten per dier in zijn gehele leven (dus inclusief voorafgaande experimenten of in geval van re-use)?*
  Antwoord: >> Deze informatie is toegevoegd in de Appendix 3.4.4.1 zodat hier nu staat: In all cases, we impose the condition that an individual monkey receives no more than two intracranial implants in total (headposts are not considered intracranial implants) and has not undergone serious discomfort.

- *Wat is het welzijn van het dier dat onder het huidige DEC protocol?*
  Antwoord: >> >> Deze informatie is toegevoegd in het PojectProposal document onder 3.4.3 als: The animals that are currently involved in this project have been implanted with a headpost only (no intracranial implants). They are both healthy and cooperative, and there have not been any complications in their training.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): niet van toepassing
    - 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.
   Het project is vergunningplichtig.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning.
   Nieuwe aanvraag – Zie A4

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
   Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.
   Er zijn geen DEC-leden uitgesloten van de behandeling en het opstellen van het advies. Alle DEC leden zijn onafhankelijke externe leden.

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 als hoofddoelstelling: **Het verkrijgen van inzicht hoe diepe hersenstimulatie (DHS) van neurale netwerken betrokken bij beloningsgerelateerde functies, hersenactiviteit en gedrag beïnvloedt.** Bij psychiatrische aandoeningen zijn hersenactiviteit en gedragsaspecten vaak verstoord. De nieuwe inzichten leveren aanknopingspunten ter verbetering van de huidige DHS behandeling van patiënten met dergelijke psychiatrische stoornissen.

   De nieuwe inzichten worden verkregen door een drietal specifieke subdoelen te realiseren. Deze zijn: 1) Welke netwerken worden geactiveerd en geïnactiveerd door DHS in de verschillende targetgebieden. 2) Hoe is het patroon van activatie afhankelijk van de gebruikte stimulusparameters. 3) Op welke manier zijn de gedragsveranderingen afhankelijk van DHS in de verschillende targetgebieden en de stimulatieparameters.

   De DEC komt tot de conclusie dat de opbouw van de aanvraag overeen komt met voorbeeld 1 van de handreiking 'Invulling definitie project'. De proeven voor de opeenvolgende iteraties en subdoelen vertonen een logische tijds- en uitkomstafhankelijke opeenvolging en zijn verbonden door go/no go momenten bepaald door de kennis verkregen uit de parallelle reeks experimenten. Gezamenlijk leidt dit uiteindelijk tot het bereiken van het hoofddoel.

   Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. 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 dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande komt de DEC tot de conclusie dat de aanvraag voldoende samenhang heeft en daarmee toetsbaar is.

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).**
   Dit valt buiten de taakstelling van de DEC als beschreven in artikel 18a.2.b van de Wod. Naar deze specifieke informatie wordt in het aanvraagformulier en de bijbehorende toelichting niet gevraagd en de aanvrager heeft deze informatie dan ook niet verstrekt. Het is voor de DEC daarom niet mogelijk om op dit punt een onderbouwde uitspraak te doen. De DEC wil erop wijzen dat mocht dit in sommige omstandigheden wel het geval zijn dat de CCD in een procedure voorziet waarin de aanvrager inzage krijgt en verweer kan voeren.

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 doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling. De geschetste samenwerking met de kliniek biedt een reëel uitzicht op toepassing van de resultaten binnen de huidige DHS behandeling.

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 *doel* van het project is Het verkrijgen van inzicht hoe diepe hersenstimulatie (DHS) van neurale netwerken betrokken bij belonings-gerelateerde functies, hersenactiviteit en gedrag beïnvloedt. DHS is een gangbare behandeling van verschillende psychiatrische stoornissen in het bijzonder van compulsieve stoornissen en depressie. DHS heeft in ongeveer de helft van de patiënten een positief resultaat. Het is echter niet duidelijk waarom de aanpak in de andere helft niet leidt tot goede resultaten. Gebleken is dat kleine variaties in stimulatiegebied en stimulatieparameters het verschil kunnen maken tussen falen en succes. Omdat in patiënten het aantal variaties dat onderzocht kan worden beperkt is ontbreekt een systematisch onderzoek naar de effecten van DBS in verschillende gebieden en stagneert de verbetering van de resultaten van DBS in de kliniek. In proefdieren is een dergelijk systematisch onderzoek van de verbanden tussen stimulatieparameters (welk gebied - welke elektrische parameters), geactiveerde/geïnactiveerde circuits, en gedragseffecten wel mogelijk. De zeer grote overeenkomst van de anatomie van de betrokken hersengebieden tussen de mens en de resusaap maakt dat het gebruik van deze soort de beste kans biedt op het realiseren van de doelstelling.

De DEC is ervan overtuigd dat het directe doel van het project gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en inzicht gegeven in de stand van zaken in de kliniek. Tevens is gepresenteerd wat de resultaten van het al verrichte werk van de onderzoeksgroep is. Dit is voor de DEC reden om te concluderen dat het voorgestelde onderzoek met de voorgestelde aanpak haalbaar is (directe doel) en dat de nieuwe kennis zal bijdragen aan een verbetering van DHS in patiënten (indirect doel / translationeel doel). Het project kent tevens een fundamenteel-wetenschappelijke component. De resultaten van de systematische verkenning van hebben een wetenschappelijke waarde en zullen bijdragen aan een beter begrip van de werking van het brein en in het bijzonder hoe gedrag en de activiteitspatronen van neurale netwerken samenhangen.

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 onderzoeksproject zijn: De maximaal 5 resusapen. De integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door de gevangenschap zullen de dieren geen natuurlijk (groeps)gedrag kunnen ontplooien zoals onder meer natuurlijke omstandigheden. De dieren zullen matig ongerief ondervinden ten gevolge van meerdere chirurgische ingrepen die ze in de loop van de proef zullen ondergaan. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze perioden van dorstgevoelens ondervinden. Gedurende een deel van de tijd zullen de dieren in een fMRI worden vastgezet. Na afloop van de proef zullen de dieren in de meeste gevallen worden gedood. De bij de uitvoering van het project betrokken onderzoekers. Zij zullen een substantiële toename in kennis en vaardigheden verkrijgen. De carrièremogelijkheden van de onderzoekers zullen verbeteren door publicaties. Ook de kans op het behouden en verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden, veelal deels gebaseerd op een goede wetenschappelijke reputatie, zal toenemen. Onderzoekers in veld van de neurobiologie en psychiatrie. Dit onderzoek kent een fundamenteel-wetenschappelijke component en de te verwachte toename van de kennis over het ontwikkelen en toepassing van DHS zal worden gedeeld door publicaties. De

wetenschappelijke resultaten zijn van algemeen belang om de werking van het brein beter te begrijpen en in het bijzonder hoe gedrag en de activiteit van neurale netwerken samenhangen. De doelgroepen in de maatschappij. Dit onderzoek zal na voltooiing een realistische kans bieden om DHS te verbeteren. Dit zal ertoe leiden dat DHS voor meer patiënten in een verbetering van kwaliteit van leven zal resulteren.

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

Proefopzet en haalbaarheid

6. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).*
De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en de geschikte voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De voorstellen bouwen voort op de ruime kennis en ervaring die is verkregen door de uitvoering van technisch sterk vergelijkbare experimenten met resusapen binnen de groep.

De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende expertise heeft om gedurende het project te kunnen blijven voldoen aan de 3V's.

7. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).*
De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen van het project en bij recente wetenschappelijke inzichten. De keuze van het model en de keuze voor de resusaap als proefdier. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen die bruikbaar is voor de kliniek.
Tijdens de uitvoering van het project zullen de in de aanvraag beschreven kaders, inclusief de kaders van ongerief, nauwgezet door de IvD bewaakt worden. Dit is inclusief de dieren die op dit moment al worden gebruikt bij proeven die door de DEC onder de oude Wod zijn goedgekeurd. Deze proeven zullen door de IvD worden getoetst of ze inderdaad passen binnen het kader van deze aanvraag, de wetenschappelijke opzet wordt bezien en er wordt bekeken of de ongeriefsaspecten overeenkomen met het in de aanvraag geschatte ongerief.

Welzijn dieren

8. 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)

De doelstellingen van het project vallen binnen de voorwaarden die door de Wod aan het gebruik van niet-menselijke primaten worden verbonden. De keuze voor de resusaap als proefdier is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Andere diersoorten (honden, katten, varkens, muizen, ratten) die als "lager" worden gekenschetst dan de niet-humane primaten zijn niet geschikt door de complexiteit van de benodigde visuele gedragstaken. De grote anatomische overeenkomsten van de anatomie van de targetgebieden in de mens en de resusaap zijn een essentieel onderdeel om een bruikbare toepassing van de resultaten in de kliniek mogelijk te maken.

Er bestaan geen alternatieven op basis van (stam)celllijnen of computermodellen. Nader onderzoek van de beschikbare klinische data biedt geen reëel uitzicht op verbetering van de DHS behandeling.

De DEC komt tot de conclusie dat voor het bereiken van de doelstelling apen (*Macaca mulatta*) de meest geschikte diersoort is.

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.
De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De onderzoeksgroep doet veel moeite om de dieren sociaal te huisvesten en een verrijkte omgeving te bieden. Er is contact met een etholoog die adviezen geeft om een optimale selectie te maken voor de gepaarde huisvesting van de dieren en om de huisvestingcondities te optimaliseren.

10. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*.
De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De onderzoekers hebben veel ervaring met dit onderzoek en zijn voortdurend op zoek naar verbeteringen in huisvesting, chirurgische methoden en proefopzet om het ongerief te verminderen.

Het cumulatieve ongerief is door de onderzoekers ingeschat als matig. De DEC onderkent dat de classificering van het cumulatieve ongerief voor dit type dierproeven niet eenvoudig is. De proeven duren lang (tot 4 jaar) en de dieren ondergaan in die periode verschillende chirurgische ingrepen met telkens periodes van maximaal 3-4 dagen matig ongerief en daarnaast verschillende langere periodes waarin de aap gedragstaken moet uitvoeren onder milde druk van waterrestrictie (mild ongerief). Het lijkt aannemelijk dat niet-humane primaten, met hun hoge sociale intelligentie, sterk reageren en anticiperen op terugkerende momenten van ongerief die zich gedurende een lange periode in hun leven voordoen. Het is echter de vraag of het cumulatieve ongerief om die reden hoger ingeschat moet worden dan het matige ongerief van de

afzonderlijke handelingen en dus bijvoorbeeld ingeschat zou moeten worden als ernstig. De DEC meent dat waarnemingen bij eerdere experimenten van vergelijkbare aard in bij de aanvragende instelling geen feiten en omstandigheden hebben opgeleverd die aan die opvatting concrete steun geven. De DEC heeft hierover aanvullende informatie opgevraagd aan de IvD. De IvD heeft op basis van eigen ervaringen met de al lopende proeven aangegeven het ongerief te zien als cumulatief matig. De IvD is tevens van mening dat, juist door het langzaam gewennen van de dieren aan de huisvesting en de gedragstaken, er een situatie ontstaat waarbij de dieren coöperatief zijn en dat er geen sprake is van een grote psychische of fysieke belasting van de dieren tijdens de uitvoering van de gedragstaken en metingen in de fMRI. Bij het gebruik van andere diersoorten is het onwaarschijnlijk dat een dergelijke situatie zal kunnen worden gecreëerd en bij het gebruik van bijvoorbeeld honden, katten of varkens zou er eerder sprake zijn van ernstig ongerief.
Alles overwegende komt de DEC tot het oordeel dat een inschatting "cumulatief matig ongerief" op zich een goede weergave is van het ongerief in het licht van wat er in de Wet op de dierproeven bedoeld wordt met de term "ongerief".

Dit alles neemt niet weg dat de DEC oog heeft voor het feit dat het zeer langdurige experimenten betreft, waarin de dieren gedurende langere periodes dagelijks worden ingezet in experimenten waarin zij met hun hoofd worden vastgezet, dorstgevoelens hebben en taken moeten verrichten waarmee zij vloeistof kunnen verdienen. Wellicht wennen zij hieraan en ervaren ze het – na die gewenning - niet als ongerief, maar feit is dat de dieren jarenlang in gevangenschap leven en hun leven volledig in het teken staat van deze experimenten. Het betreft dieren die zowel sociaal als psychologisch zeer complex zijn en dit stelt hoge eisen aan de omgeving en de sociale verbanden waarin de dieren leven. Er wordt weliswaar een reeks maatregelen genomen om de dieren een verrijkt leven te bieden maar dit is geen volwaardige vervanging voor een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. Het is echter lastig om te bepalen welke voor de dieren belangrijke natuurlijke gedragskenmerken ze worden ontzegd door de huisvesting en de experimenten en het is daarom moeilijk te bepalen in welke mate dit tot een aantasting van het welzijn en de integriteit van de dieren leidt.

In de aanvraag is er sprake van de mogelijkheid dat de dieren na afloop van de experimenten gaan deelnemen aan experimenten onder andere CCD vergunningen; de aanvragers noemen dit "re-use". Hieraan is de voorwaarde verbonden dat het dier, naast de headpost, nooit meer dan twee craniale zal krijgen en dat er zich geen (onvoorziene) omstandigheden hebben voorgedaan waarbij sprake was van ernstig ongerief.
In de aanvraag is er ook sprake van re-use vanuit experimenten in het kader van andere CCD vergunningen. Hiervoor zijn heldere voorwaarden gepresenteerd. Ook voor deze dieren geldt dat het dier nooit meer dan twee craniale zal krijgen en dat er zich geen (onvoorziene) omstandigheden hebben voorgedaan in de voorafgaande experimenten waarbij sprake was van ernstig ongerief.

Het voordeel van de geschetste praktijk van re-use is dat het totaal aantal dieren hierdoor zal verminderen. Het nadeel is dat het ongerief voor een individueel dier zal toenemen maar dat een extra periode van gewenning aan de faciliteit en trainingsprocedures wordt voorkomen. De DEC volgt de motivering van de aanvragers m.b.t. het gebruik van een dier voor vervolgexperimenten maar omdat het ongerief van het individuele dier groter wordt is het ook denkbaar dat het gebruik van meer dieren te prefereren is. De DEC heeft dit in een eerder advies als dilemma benoemd.

11. 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 integriteit van de dieren zal op verschillende manieren worden aangetast. Door het

leven in gevangenschap zullen de dieren zich niet kunnen ontplooien zoals in een zelfstandig bestaan in groepsverband in natuurlijke omstandigheden. De dieren worden weliswaar paarsgewijs gehuisvest, dit is een belangrijke verbetering t.o.v. solitaire huisvesting, maar het stelt de resusapen niet in staat om een normale sociale groepsstructuur te vormen. Ook met de talrijke "verrijkingen" die de dieren worden verstrekt, kan niet volledig worden voldaan aan hun sociale en psychische behoeften. Prikkels en omstandigheden waaraan de dieren in natuurlijke omstandigheden voldoening of welzijn zouden ontlenen worden zoveel mogelijk nagebootst of vervangen door andere prikkels en omstandigheden waarvan men aanneemt dat die een vergelijkbaar effect zullen hebben. Feit blijft echter dat het om een kunstmatige omgeving gaat waarin men onvermijdelijk op beperkingen stuit. Er worden de dieren ervaringen die hen voldoening en plezier geven onthouden (zie ook C10). Ten behoeve van de experimenten worden diverse implantaten in en op het hoofd aangebracht. Tijdens de uitvoering van de complexe gedragstaken zullen de dieren met hun hoofd worden vastgezet en zullen ze periodes van dorstgevoelens ondervinden. Na afloop van de proef, of na hergebruik, zullen de dieren merendeels worden gedood.

12. 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 humane eindpunten zijn voor elk van de bijlagen dierproeven duidelijk gedefinieerd. De DEC is het met de aanvrager eens dat de kans klein is dat de dieren een humaan eindpunt zullen bereiken; dit op basis van ervaring. De aanvrager zal gedurende de gehele uitvoering van de proef het welzijn nauwgezet monitoren. De DEC is daarom van mening dat de aanvrager, indien de dieren toch een humaan eindpunt bereiken, tijdig in kan grijpen om onnodig lijden te voorkomen.

3V's

13. 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 DEC is van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen vervangingsalternatieven zijn. De stand van zaken in het veld van de DBS is dat door onderzoek in patiënten weinig tot geen vooruitgang meer kan worden geboekt. De aanvrager heeft aannemelijk gemaakt dat alleen een systematische inventarisatie van de verbanden tussen stimulatieparameters – circuits – gedrag, DHS als therapie kan verbeteren. Dit is in patiënten niet mogelijk gezien de risico's van het herhaald inbrengen van elektrodes, de vele fMRI sessies en de kans op infecties van het implantaat. Niet invasieve methodes zijn niet bruikbaar.
De zeer grote overeenkomst van de anatomie van de betrokken hersengebieden tussen de mens en de resusaap maakt dat het gebruik van deze soort de beste kans biedt op het realiseren van de doelstelling.
De DEC is tot de conclusie gekomen dat voor het bereiken van de doelstelling apen (*Macaca mulatta*) de meest geschikte diersoort is.

14. 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 is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is geraamd en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De aanvrager verwacht dat voor de proef 4 dieren nodig zijn. De DEC is zich bewust van het feit dat een aantal van 2 dieren gangbaar binnen in dit wetenschappelijke veld maar de aanvrager betoogt dat het grote aantal te onderzoeken parameters (stimulatieposities –

stimulus parameters) en te verachten anatomische variatie tussen dieren en de variatie in fMRI resultaten er een noodzaak is om naar verwachting vier dieren te gebruiken. Met dit aantal zullen de resultaten voldoende onderbouwing bieden voor extrapolatie naar patiënten. Het is niet uit te sluiten dat er zich in de loop van het project omstandigheden voordien die de inzet van een extra dier noodzakelijk maken. De criteria voor het gebruik van een vijfde dier binnen het project zijn duidelijk beschreven in de aanvraag. De aanvrager heeft de DEC informatie verschaft over de kans is dat het gebruik van een extra dier noodzakelijk zal blijken te zijn. Op basis van eigen ervaring wordt die kans op 22% geschat. De DEC onderschrijft de verwachting dat er een redelijke kans is dat het uiteindelijke aantal dieren op vijf uitkomt.

De DEC concludeert dat het totaal aantal dieren op maximaal vijf dieren zal uitkomen. In het geval de noodzaak ontstaat om meer dan vijf dieren is een wijziging noodzakelijk.

Naar de mening van de DEC zijn de randvoorwaarden voldoende duidelijk beschreven om de IvD in staat te stellen de noodzaak van een vijfde dier te kunnen beoordelen. Door de gefaseerde aanpak van het project wordt optimaal gebruik gemaakt van de proefdieren. Het gebruik van dieren vanuit andere proeven verhoogt het ongerief voor het individuele dier maar het vermindert het totaal aantal benodigde dieren. De DEC heeft dit in een eerder advies als een dilemma gesignaleerd.

15. 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 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 dieren worden geleidelijk blootgesteld aan nieuwe aspecten van de uitvoering van de gedragstaken. Een nauwgezette registratie van de hoeveelheid gedronken water vindt plaats om zo uitdroging en schade op de langere termijn te voorkomen. De chirurgische ingrepen worden door ervaren personeel uitgevoerd. De implantaten worden aangepast aan de individuele dieren zodat het de kans op complicaties wordt verminderd. De dieren krijgen gehoorbescherming tegen de herrie wanneer ze in de fMRI zitten. De verwachting is dat humane eindpunten, dus om redenen van lijden van het dier, zelden zullen worden bereikt.

16. 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.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Naar verwachting zullen de meeste dieren in proef na afloop worden gedood en het weefsel wordt voor ex-vivo studies gebruikt. Zie voor details onder C10 en C18.

17. 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 aanvrager gebruikt uitsluitend mannelijke dieren omdat mannelijke dieren zich makkelijker aanpassen aan de gepaarde huisvesting dan vrouwen. Het gebruik van beide geslachten beperkt de mogelijkheden om ideale duo's te vormen voor de huisvesting hetgeen van groot belang is voor het welzijn van de dieren.

18. 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).*

Indien nodig in het kader van het onderzoek worden de dieren gedood om zo inzicht te krijgen naar de exacte posities van de stimulatie elektrodes in het brein. Er wordt een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt volgens bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU (overdosis barbituraten gevolgd door cardiale perfusie met fixatief).

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.
Wanneer er geen noodzaak tot doden is kan het dier ook gaan deelnemen aan experimenten onder andere CCD vergunningen ("re-use"; zie C10). In andere gevallen kan het dier blijvend worden gehuisvest binnen het Instituut. Dit betreft bijzonder sociale dieren die een rol spelen in het acclimatiseren aan de huisvesting van nieuwe dieren. Ook zal worden overwogen om de dieren in een primatenopvangcentrum te huisvesten. Zie het NCad advies over herplaatsing: https://www.ncadierproevenbeleid.nl/adviezen-ncad/documenten/rapport/2016/5/17/ncad-advies-herplaatsing). De DEC wijst erop dat de mogelijkheden tot herplaatsing uiterst beperkt zijn, een extra chirurgische ingreep vereisen met matig ongerief als gevolg, en het overplaatsen van een resusaap naar een nieuwe omgeving/kolonie aanzienlijke stress oplevert voor het dier (de DEC heeft al in een eerder advies een dilemma gesignaleerd m.b.t. de herplaatsing). De DEC adviseert dat voor wat betreft de besluitvorming rondom een eventuele herplaatsing wordt verwezen naar genoemd NCad document (i.h.b. pagina 42-45). In het kort; de *vergunninghouder* besluit, geadviseerd door de IvD.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).*
Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht hoe diepe hersenstimulatie (DHS) van neurale netwerken betrokken bij belonings-gerelateerde functies, hersenactiviteit en gedrag beïnvloedt het cumulatieve matige ongerief dat maximaal 5 resusapen wordt aangedaan in het voorliggende project, de subdoelen daarbij in aanmerking nemend?

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 volgende waarden/belangen zijn in het geding (zie onderdeel C5):
Waarden/belangen met betrekking tot de proefdieren: *maximaal matig nadeel*. Dit nadeel bestaat uit meerder periodes van matig ongerief ten gevolge van het uitvoeren van de proef en uit langere periodes van licht ongerief door de uitvoering van complexe visuele gedragstaken en periodes in een fMRI opstelling. De dieren zullen onder de gegeven huisvestingscondities, ondanks de uitgebreide reeks maatregelen om het welzijn te verbeteren, niet hun gehele repertoire aan natuurlijk groepsgedrag tot uiting kunnen brengen.

Waarden/belangen van de onderzoekers: *veel voordeel*. Deze belangen bestaan voornamelijk uit het verbeteren van hun positie in het betrokken wetenschappelijke veld. Deze waarden zijn naar opvatting van de DEC echter van gering gewicht voor de ethische afweging.

Waarden/belangen met betrekking tot de doelgroepen binnen het veld van de neurobiologie en de psychiatrie: *veel voordeel*. Met de huidige kennis over de toepassing van DHS als behandeling voor psychiatrische afwijkingen (m.n. depressie en obsessief compulsieve stoornissen) kan voor ongeveer de helft van de patiënten een verlichting van de klachten geven. Het voorgenomen project zal unieke gegevens genereren die inzichten geven voor een verbetering van DHS als therapie. De wetenschappelijke resultaten, meer inzicht in de relatie tussen hersenactiviteit en gedrag, zijn van groot belang.

Waarden/belangen met betrekking tot de maatschappij (patiëntengroepen, *andere wetenschapsgebieden): veel voordeel.* De aanpak biedt een reële mogelijkheid om DHS als therapie te verbeteren. De mate van verlichting van de klachten zal toenemen en ook de kans op verlichting zal hoger worden. Dit zal voor patiënten resulteren in een aanzienlijke verbetering van de kwaliteit van leven. De dierexperimenten zijn een essentiële stap om DHS te verbeteren.

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

   - Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit resulteren in een aanmerkelijke toename de technische en fundamenteel wetenschappelijke kennis die noodzakelijk is om de eerste trials in patiënten op een ethisch verantwoorde manier mogelijk te maken. De experimenten op niet-humane primaten zijn naar opvatting van de DEC de enige manier om uiteindelijk te komen tot een significante verbetering van DHS als therapie.

- De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en recente wetenschappelijke inzichten en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

- Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken is het nodig proefdieren te gebruiken. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken waardoor het uiteindelijk ongerief van elk individueel dier, naar verwachting, beperkt blijft tot maximaal matig ongerief. Zie voor een uitgebreide motivatie m.b.t. het ongerief onderdeel C10.

- De DEC is er van overtuigd van het belang van de wetenschappelijke doelstelling en het belang van de nieuwe kennis. Verschillende subsidiegevers steunen het project.

- De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, en tijdens de uitvoering van het project te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.

- De DEC is van mening dat de aanvrager bij de uitvoering van het project alle mogelijke maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

Gezien bovenstaande overwegingen is de DEC van opvatting dat het bereiken van de doelstelling, op de wijze zoals beschreven in deze projectaanvraag, het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   - ■ De DEC adviseert de vergunning te verlenen voor maximaal 5 dieren.
   - ☐ 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
     - x Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten: Gegeven de informatie over de kans op de noodzaak van een vijfde aap is de DEC van mening dat de vergunning afgegeven moeten worden voor een maximum van vijf dieren. In het geval de noodzaak ontstaat om meer vijf dieren te gebruiken is een wijziging noodzakelijk.

       Een plan van aanpak te overleggen aan de CCD met betrekking tot die apen die niet worden gedood in het kader van de proef en die niet in aanmerking komen voor hergebruik binnen proeven uitgevoerd in het kader van andere CCD vergunningen.
   - ☐ 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).*
Het advies is unaniem.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).*
De DEC heeft in een eerder advies een drietal dilemma's gesignaleerd: 1) het al dan niet toepassing van re-use, 2) de problematische inschatting van het niveau van cumulatief ongerief en 3) de opvang na afloop van de proef versus doden van de dieren. Deze dilemma's zijn ook van toepassing binnen dit project maar worden hier niet herhaald.

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted] 20172425
Bijlagen
2

Datum 7 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 augustus 2017. Het gaat om uw project "Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is [redacted] 20172425. 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:
7 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172425

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformuller
- Factuur

Datum:
7 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172425

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	15 september 2017
Geplande einddatum:	15 september 2022
Titel project:	Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry.
Titel niet-technische samenvatting:	Cognitieve effecten van diepe hersenstimulatie in het kader van de behandeling van psychiatrische aandoeningen
Naam DEC:	[redacted]
Postadres DEC:	[redacted]
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [redacted]

Functie: [redacted]

Plaats: [redacted]

Datum: 3 augustus 2017

Datum:
7 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172425

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted] 20172425
Bijlagen
2

Datum 7 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 7 augustus 2017
Vervaldatum: 6 september 2017
Factuurnummer: 172425

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag [redacted] 20172425	€ 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: Info-zbo
Verzonden: maandag 28 augustus 2017 10:46
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: vraag bij de behandeling van [redacted] 20172425

Geachte [redacted],
Uw aanvraag [redacted] getiteld 'Investigating the effects of bram stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavioguide for deepbrainstimulationtreatmentsinpychiatry' is door de CCD in de vergadering besproken. Er is besloten uw aanvraag te vergunnen nadat de NTS onder 3.2 is aangepast. De zin : *Hiermee krijgt een groep patiënten die alle conventionele behandelmethoden al zonder succes heeft geprobeerd (ongeveer 10%) toch weer uitzicht op een normaal leven.* Is erg optimistisch gesteld en loopt vooruit op de uitkomsten van dit project. Kunt u deze zin aanpassen of verwijderen?
De leges voor dit project zijn nog niet ontvangen. Totdat de NTS is aangepast en de leges zijn ontvangen is de behandeltijd van dit project 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!)

8.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted]172425
Bijlagen
1

Datum 11 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 7 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry." met aanvraagnummer [redacted]0172425. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 1 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is u gevraagd de tekst onder 3.2 in de Niet Technische Samenvatting te herzien. Deze loopt vooruit op de uitkomsten van het onderzoek en is derhalve te optimistisch gesteld.

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 "Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry." starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 september 2017 tot en met 14 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

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

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [redacted] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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

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

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

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

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummers:
[redacted]020172425

Centrale Commissie Dierproeven
[redacted]

Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: [redacted]

Adres: [redacted]
Postcode en plaats: [redacted]
Deelnemersnummer: [redacted]

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 september 2017 tot en met 14 september 2022, voor het project "Investigating the effects of brain stimulation on the neural mechanisms of goal-directed behavior as a guide for deep brain stimulation treatments in psychiatry." met aanvraagnummer [redacted]0172425, volgens advies van Dierexperimentencommissie [redacted]. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted].
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 augustus 2017, ontvangen op 7 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Neuroimaging (MRI), Electrical Stimulation, and Neurophysiological Recordings				
	Rhesusapen (Macaca mulatta) /	5	100% Matig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen
Dit project wordt voorzien van beoordeling achteraf.Deze beoordeling zal uiterlijk september 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:
[redacted]20172425

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

ikt
en

van
g.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
[redacted]20172425

Weergave wet- en regelgeving

ven
in
n de

en
ze

pijn,
ij

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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

Aanvraagnummer:
[redacted]20172425

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.

Beoordeling achteraf
Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

2726

Centrale Commissie Dierproeven

1.

25 JUL 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* 32600

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	PD ALt / Intravacc
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	

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	Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
Postbus	450
Postcode en plaats	3720 AL Bilthoven
IBAN	NL74INGB0705003612
Tenaamstelling van het rekeningnummer	PD ALt

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 10 - 2017
		Einddatum	1 - 10 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bepalen van de werkzaamheid van vaccins in het kader van Europese Vrijgifte door de overheid	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC ALt
		Postadres	Postbus 450 (kamer D5.31), 3720 AL Bilthoven
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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	Bilthoven
Datum	24 - 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.	32600
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc
1.3	Vul de titel van het project in.	Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins

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.

Geneesmiddelen worden door fabrikanten geproduceerd en getest conform een goedgekeurd registratiedossier (ook 'marketing authorisation file' genoemd). Voor vaccins geldt er hiernaast de verplichting tot 'vrijgifte van vaccins door de overheid'. Hieronder wordt verstaan de beslissing van een nationaal controle laboratorium (Official Medicines Control Laboratory (OMCL)) dat een charge van een immunologisch geneesmiddel voldoet aan de eisen die in het registratiedossier en de Europese Farmacopee zijn vastgelegd. Vaccins mogen door fabrikanten niet worden geleverd voordat de partij door de overheid is vrijgegeven (Regeling Geneesmiddelenwet Hoofdstuk 6).
Conform artikel 114 van Directive 2001/83/EC en amendement Directive 2004/27/EC is er wederzijdse erkenning van deze vrijgifte binnen alle EU/EEA lidstaten (en andere landen die een formele overeenkomst hebben) die vrijgifte voor dat product voorschrijven. In de praktijk is de vrijgifte voor de Nederlandse markt hierdoor een vrijgifte voor de Europese markt. Binnen Europa wordt dit Official Control Authority Batch Release (OCABR) genoemd.
Binnen het Europese netwerk van OMCL's is afgesproken welke (van de in het registratiedossier opgenomen) testen het meest indicatief zijn voor veiligheid en/of werkzaamheid van de partij. Deze testen dienen herhaald te worden door het OMCL. Dit is vastgelegd in product-specifieke OCABR richtlijnen (te vinden op de EDQM-website). Voor dit projectvoorstel is in het bijzonder "Official Control Authority Batch Release Of Diphtheria and Tetanus Vaccine (Adsorbed)" (PA/PH/OMCL (11) 113 DEF) van toepassing. Naast de testen die herhaald worden door het OMCL, worden ook de resultaten van de testen uitgevoerd door de fabrikant en de belangrijkste parameters uit het productieproces van de fabrikant getoetst aan het registratiedossier. Onze organisatie is het OMCL van Nederland.
Dierproeven worden alleen opgenomen in de OCABR richtlijnen wanneer de dierproef tot de belangrijkste indicatoren voor werkzaamheid of veiligheid van een vaccin behoort. Dit betreft voornamelijk de vaccins waar werkzame bestanddelen niet voldoende gekarakteriseerd zijn en een *in vitro* alternatief niet voorhanden is. Voor de partijen die onze organisatie vrijgeeft vallen alleen difterie tetanus polio (DTP) vaccin en tetanusvaccin in deze categorie.

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 Europese vrijgifte van vaccins is om alleen partijen vaccins toe te laten tot de markt die voldoen aan de eisen. Voor zover het dierproeven betreft betekent dit, dat het doel is om te bevestigen dat de geproduceerde partijen difterie tetanus polio (DTP) en tetanusvaccin voldoen aan de werkzaamheidseisen die het registratiedossier en de Europese Farmacopee aan deze producten stellen. Voor het aantonen van de werkzaamheid van deze difterie- en/of tetanustoxoïd bevattende vaccins is geen geaccepteerd *in vitro* alternatief aanwezig.
Het project is haalbaar, omdat het al sinds 1999 succesvol uitgevoerd wordt.

3.3 Belang

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

Vaccins worden in het kader van de volksgezondheid gegeven aan groepen gezonde mensen, veelal op voorspraak van en georganiseerd door de nationale overheid (rijkvaccinatieprogramma). Een substantieel deel van het rijksvaccinatieprogramma betreft kwetsbare individuen, zoals kinderen. Dit geeft aan dat er een aanzienlijk maatschappelijk belang is in de borging van kwaliteit (samengesteld uit werkzaamheid en veiligheid) van vaccins. Verder is de productiewijze van vaccins inherent variabel. Dit geldt ook voor de biologische testen die gebruikt worden om werkzaamheid en/of veiligheid te demonstreren. Om deze redenen is er in de wet een extra (overheids)controle opgenomen die voor de

meeste overige geneesmiddelen niet geldt. Het maatschappelijk belang is dat er alleen vaccins tot de markt worden toegelaten die veilig en werkzaam zijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Wanneer een fabrikant een partij DTP- of tetanusvaccin instuurt naar het OMCL dient deze beoordeeld te worden. Hiervoor worden de details van productie en testen door de fabrikant gecontroleerd en wordt voor iedere geproduceerde final bulk een werkzaamheidstest van de tetanuscomponent DTP- en tetanusvaccin) en de difteriecomponent (DTP-vaccin) uitgevoerd. Voor de werkzaamheid van de difterie- en tetanuscomponent in DTP vaccin is een 3R reductieschema ingevoerd, waardoor niet elke, maar één op de vier bulken (met een minimum van een per jaar) op werkzaamheid getest hoeft te worden. Een dergelijk 3R reductieschema is fabrikant- en product-specifiek en mag door een OMCL aangevraagd worden wanneer er sprake is van bewezen consistentie in testresultaten en productie. Veelal wordt de eerst aangeboden bulk ingezet omdat niet duidelijk is of er nog andere bulken zullen volgen in dat jaar.
De werkzaamheidstesten voor de difterie- en tetanuscomponenten worden uitgevoerd conform de Europese Farmacopee (resp. 2.7.6 en 2.7.8) en het registratiedossier van de vaccins.
Zowel de bepaling van de werkzaamheid voor de tetanuscomponent als de difteriecomponent zijn één type dierproef, die voor wat betreft dierexperimentele handelingen niet van elkaar verschillen: het zijn serologische testen in muizen, waar de antiserum respons die een vaccin opwekt wordt vergeleken met de respons die een referentievaccin opwekt.
Binnen dit type dierproeven zijn er wel minimale verschillen: zo worden er verschillende immunisatiedoses en groepsgroottes gehanteerd, geoptimaliseerd voor de te testen component in het te testen vaccin. Ook de uiteindelijke *in vitro* serologische bepaling verschilt tussen de difterie- en de tetanusbepaling, maar meet beide de functionaliteit van de opgewekte antilichamen: tetanus toxine binding inhibitie (ToBI) voor tetanus en de bescherming van vero-cellen tegen difterie toxine voor difterie.

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

Een werkzaamheidstest voor difterie- en tetanuscomponent dient uitgevoerd te worden voor DTP vaccin (met inachtneming van het bij 3.4.1. genoemde 3R reductieschema), bij tetanusvaccin dient een werkzaamheidstest voor de tetanuscomponent uitgevoerd te 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.

Zie 3.4.2 Er is geen sprake van mijlpalen of keuzemomenten, tenzij een test niet voldoet aan de gestelde validiteitscriteria of een partij vaccins niet voldoet aan de specificaties. In deze situaties behoort de keuze voor herhaling van de test tot de mogelijkheden.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Serologische bepaling werkzaamheid DTP en Tetanus vaccins
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	

3.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	32600
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Intravacc
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Serologische bepaling werkzaamheid DTP en Tetanus vaccins

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De keuze voor de experimentele aanpak voor deze wettelijke taak ligt vast in de Europese Farmacopee, het registratiedossier van de betreffende vaccins en de richtlijnen van het Europese netwerk van rijkscontrole laboratoria.
Vaccins hebben tot doel een immuunrespons op te wekken in mensen. Dat een vaccin hiertoe in staat is, is vastgesteld in klinische studies die zijn vastgelegd in het registratiedossier. In dit registratiedossier is ook vastgelegd hoe dit vaccin geproduceerd en hoe de kwaliteit ervan bewaakt wordt. Alleen partijen vaccins die voldoen aan de eisen uit het registratiedossier en de Europese Farmacopee worden geacht consistent te zijn met de partijen uit de klinische studies en mogen op de markt worden gebracht.
Als correlaat met de klinische werkzaamheid bij mensen van difterie en tetanus toxoïde bevattende vaccins zijn een werkzaamheidstesten opgenomen in de Europese Farmacopee (monografie 2.7.6 en 2.7.8) en het registratiedossier. De geregistreerde werkzaamheidstest wordt uitgevoerd in muizen. Het betreffen serologische bepalingen op sera van muizen die geïmmuniseerd zijn met Difterie-Tetanus-Polio (DTP) of Tetanusvaccin of een referentievaccin. De antisera titers van de muizen die met het te testen vaccin zijn geïmmuniseerd worden vergeleken met de titers die door het referentievaccin worden opgewekt. Voor DTP vaccin wordt hiervoor een parallelle lijn analyse uitgevoerd, voor tetanusvaccin een limiet test. Voor beide producten zijn specificaties in het registratiedossier en de Europese Farmacopee vastgelegd, wanneer een vaccin voldoet aan de specificaties kan deze worden vrijgegeven voor de Europese markt.
In de tabel bij B is te zien welke dierproeven worden uitgevoerd, hoe deze zijn opgebouwd en welke aantallen dieren (maximaal) zijn voorzien.

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 gerandomiseerd. Per groep wordt er één dosis van het te testen vaccin of referentievaccin ingespoten. Na een incubatie periode worden de dieren onder algehele narcose gebracht en verbloed. Uit het gewonnen bloed wordt serum gewonnen en hiervan wordt de titer bepaald tegen de onderzochte vaccin component.
De handelwijze ligt vast in de Europese Farmacopee (monografie 2.7.6 en 2.7.8).

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

Deze testen worden al sinds 1999 routinematig uitgevoerd, in eerste instantie waren de groepsaantallen en -groottes ingegeven door de validatie van de vaccin producent. Overwegingen om het aantal dieren terug te brengen zijn ingegeven door her-analyses van historische data. Hierbij wordt steeds gekeken naar de mogelijkheid om èn een valide test te verkrijgen èn vast te stellen of een partij aan de specificaties voldoet. In geval van een invalide test, of een partij vaccins die niet aan de specificaties lijkt te voldoen, moet namelijk een hertest worden uitgevoerd. Naast dat dit leidt tot extra gebruik van proefdieren, levert het ook een extra vertraging op waarmee de partijen vaccins toegang krijgen tot de Europese markt (geschatte vertraging minimaal 3 maanden). Hieruit voortkomende tekorten voor de Nederlandse markt en voor het Rijksvaccinatieprogramma zijn niet denkbeeldig.
Middels heranalyse van dierproeven die in het verleden zijn uitgevoerd is gesimuleerd wat het effect zou zijn geweest van reductie in het aantal proefdiergroepen en het aantal dieren per groep. Hierop zijn zowel het aantal groepen als het aantal dieren per groep teruggebracht tot het minimum dat in het verleden haalbaar bleek. Power analyses zijn voor dit type onderzoek niet mogelijk, omdat de einduitslag afkomstig is uit parallelle lijn analyse waarmee referentie en te testen vaccin worden vergeleken. Verder zijn de onderliggende serologische data geen continue, maar discrete variabelen, hetgeen veelgebruikte statistiek niet werkbaar maakt.
Het aantal dieren dat benodigd is dus uit historische data bekend. De Europese Farmacopee (monografie 2.7.6 voor difterie en 2.7.8 voor tetanus) geeft alleen aan dat "een voldoende aantal dieren gebruikt moet worden om aan de validiteitseisen te voldoen". Aan deze eis wordt nu met een minimaal aantal dieren voldaan.

B. De dieren

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

Diersoort: muizen
Herkomst: uit een geregistreerde fok of afleveringsbedrijf

Geschatte aantallen:
Het aantal dieren is afhankelijk van het aantal vaccins dat in de periode wordt aangeboden. In berekeningen wordt de bovenkant van het geschatte aantal aangehouden. Het totaal aantal geschatte dieren is 936 muizen, opgebouwd op de onderstaande wijze.

Vaccin	Opzet dierproef	Aantal groepen	Groeps-grootte	Aantal dieren/test	Aantal testen	Aantal dieren
DTP	Difterie multi dilution	[redacted]				
	Tetanus multi dilution					
Tetanusvaccin	Tetanus single dilution					
	Tetanus multi dilution					
TOTAAL						

Toelichting DTP vaccin
- Voor één final bulk DTP vaccin wordt één werkzaamheidstest ingezet voor de difteriecomponent en één werkzaamheidstestvoor de tetanus component.

- Geschatte aantal te testen final bulken voor DTP vaccin: [redacted].
- Voor de difterie en tetanus werkzaamheidstest worden voor het te testen vaccin en voor een referentiestandaard [redacted]
- Voor de difterie werkzaamheidstest is de groepsgrootte [redacted] voor de tetanus werkzaamheidstest [redacted]
- Bij geschatte aantal testen wordt rekening gehouden met het 3R reductieschema (zie sectie 2D) waardoor er slechts [redacted] per jaar wordt getest. De verwachting is dat er niet meer dan 4[redacted] per jaar zullen worden aangeleverd.
- Hertesten zijn in het verleden niet nodig gebleken maar kunnen voor de loop van het project niet uitgesloten worden.

Toelichting tetanusvaccin

- Voor één final bulk tetanus vaccin wordt één single dilution werkzaamheidstest ingezet voor de tetanus component
- Geschatte aantal te testen final bulken voor tetanusvaccin: [redacted]
- In de single dilution assay wordt één verdunning van het te testen vaccin vergeleken met één verdunning van het referentievaccin.
- Als extra randomisatie wordt in de single dilution assay iedere verdunning ([redacted].
- In een single dilution assay wordt enkel getoetst of de te testen partij aan de minimale specificaties voldoet. Door de single dilution opzet is het niet mogelijk de werkzaamheid van het vaccin te kwantificeren.
- Wanneer de werkzaamheid niet voldoet in de single dilution assay moet een multi dilution assay worden ingezet om tot een kwantitatieve uitslag te komen.
- Voor de multi dilution tetanus werkzaamheidstest worden voor het te testen vaccin en voor de referentiestandaard [redacted].
- Hertesten en multi dilution assays zijn in het verleden niet nodig gebleken maar kunnen voor de loop van het project niet uitgesloten worden.

Geslacht:
De werkzaamheidstesten worden uitgevoerd met 1 sexe per test, waarbij de disbalans tussen het gebruik van beide sexes geminimaliseerd is.

De reden om één sexe te gebruiken is, dat beide testen zijn gevalideerd met één geslacht per test en zo ook altijd zijn uitgevoerd. Op basis van deze historische testen zijn de groepsgroottes teruggebracht tot het empirisch minimum. Overgang op gelijk gebruik van beide sexes zou gevalideerd moeten worden, omdat dit consequenties kan hebben op de spreiding binnen groepen en daarmee op de einduitslag. Een dergelijke validatie zal veel extra gebruik van proefdieren betekenen (zie onder).

De volgende maatregelen worden genomen om te komen tot een minimale disbalans in het gebruik van de sexes:

- Voor iedere partij DTP moet zowel een difterie als een tetanus werkzaamheidstest gebeuren. Hierdoor worden er tegelijkertijd [redacted] van het ene geslacht in de tetanus test en [redacted] van het andere geslacht in de difterie test gebruikt; een minimaal verschil.
- Door afwisselend de difterie en tetanustest met mannetjes en de andere met vrouwtjes in te zetten wordt het totaal aantal dieren nog evenwichtiger verdeeld (over de loop van het project)
- Voor tetanus vaccin worden slechts [redacted] test gebruikt, hier valt geen combinatie te maken. Wel kunnen ook hier de testen afwisselend met mannetjes en vrouwtjes worden ingezet, zodat het gebruik over de loop van het project evenwichtig is.
- Wanneer de fabrikant van DTP en tetanusvaccin het gelijk gebruik van beide sexes valideert, kunnen de hierdoor verkregen sera ook door het controle laboratorium gebruikt worden voor de validatie. Wanneer dat gedurende de loop van het project (succesvol) gebeurt, zal overgegaan worden op een gelijk gebruik van beide sexes in iedere test.

Ter illustratie van het benodigde aantal dieren voor methodevalidatie: validatie van gebruik van beide sexes zou inhouden dat in minimaal 3 testen (per type test) de groepsgrootte met 50% verhoogd moet worden door dieren van het andere geslacht toe te voegen. Hierna zou gekeken moeten worden op basis van de gesimuleerde 50-50% verdeling van de geslachten tot dezelfde conclusie was gekomen als op basis van de 100% van hetzelfde geslacht. Hierna is er niet eens de garantie is dat gelijk gebruik van beide sexes mogelijk is. De validatie zou leiden tot een toename in het geschatte aantal gebruikte dieren:

- tetanuscomponent (single-dilution): [redacted]
- tetanuscomponent (multi-dilution): 3[redacted]
- difteriecomponent 3 testen * 8 groepen * 4 dieren= 96 extra dieren

[redacted]

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:
Voor de werkzaamheidstesten van difterie en tetanus in vaccins is geen geaccepteerd alternatief beschikbaar. Zowel registratiedossier als de Europese Farmacopee (monografieën 2.7.6 en 2.7.8) bieden geen alternatieven. Onze organisatie is wel actief in een consortium dat zich toelegt op het ontwikkelen van alternatieve testen en vooral op een alternatieve systematiek voor het garanderen van de kwaliteit van vaccins zonder dierproeven (zogenaamde “consistency approach”).

Wanneer deze of andere initiatieven succes vol zijn, zal hier binnen het project Europese vrijgifte opvolging aan worden gegeven.

Vermindering:
Europese vrijgifte is een wettelijk systeem dat gebaseerd is op wederzijdse erkenning. Een partij vaccins die door een Europese lidstaat wordt vrijgegeven, mag niet meer door een andere lidstaat worden getest. Hierdoor is herhaaldelijk testen van partijen beëindigd.
Zoals aangegeven onder 2A zijn op verschillende momenten initiatieven geweest om te komen tot vermindering van het gebruikte aantal dieren per proef. Oorspronkelijk werden er voor beide testen op DTP [redacted] per groep gehanteerd, dit is teruggebracht naar [redacted] per groep voor tetanus en [redacted] per groep voor difterie. Verdere vermindering is op het moment niet mogelijk maar wordt gedurende de loop van het project niet uitgesloten.
Hiernaast is voor DTP het totale aantal dierproeven dat wordt uitgevoerd in het kader van Europese vrijgifte teruggebracht doordat er voor dit vaccin een 3R reductieschema is. Een 3R reductieschema kan aangevraagd worden bij het netwerk van rijkscontrole laboratoria als er vertrouwen is in de kwaliteit van betreffende vaccin en test (uitslag). Verder dient ook de consistentie in productie en de correlatie van resultaten van controlelaboratorium met de fabrikant gemonitord te worden. Door dit 3R reductieschema hoeft maar [redacted] getest hoeft te worden (met een minimum van een per jaar). De grootte van de vermindering hangt dus samen met de hoeveelheid final bulken die de fabrikant maakt. De afgelopen jaren wordt er gemiddeld [redacted] per jaar aangeboden en is de gerealiseerde vermindering door het reductieschema dus beperkt.

Voor tetanus vaccin wordt een single dilution assay gebruikt (zie ook Europese Farmacopee monografie 2.7.8). Hierdoor wordt er slechts één verdunning per vaccin ingezet hetgeen proefdieren bespaart ten opzichte van een multi dilution assay [redacted]).

Verfijning:
De serologische testen zijn een verfijning ten opzichte van de klassieke "(lethal) challenge" testen. Hierbij werd immunogeniteit van de vaccins vastgesteld door de dieren bloot te stellen aan een (dodelijke) hoeveelheid difterie of tetanus toxine. De mate waarin een vaccin deze sterfte kan voorkomen is een maat voor de werkzaamheid van een vaccin. Door invoering van serologische testen is het lijden veroorzaakt door handelingen (eenmalige injectie, geen merkbaar leed door vaccinatie, groepsgewijze huisvesting zonder beperkingen, verbloeding onder volledige anesthesie) minimaal.
Aangezien het lijden van de dieren in de huidige opzet zeer beperkt is, is verdere verfijning niet mogelijk.

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 tijdens de duur van het experiment dagelijks in de gaten gehouden. Als er een dier (onverwacht) ziek wordt zal het dier vroegtijdig uit het experiment gehaald worden om onnodig lijden te voorkomen. Dit valt echter niet te verwachten.

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.

In het kader van Europese vrijgifte van vaccins is vrijgifte erkend binnen de Europa en is herhaling van deze overheidscontrole formeel uitgesloten. Doordat er openheid is binnen de vrijgevende rijkscontrole laboratoria is duidelijk dat herhaling ook in de praktijk niet gebeurt.
Opgemerkt moet worden dat de Geneesmiddelenwet een nadrukkelijke controle van vaccins door de overheid voorschrijft. De test van het rijkscontrolelaboratoium is dus technisch gezien een herhaling van de test van de fabrikant, maar dient wettelijk als een controle van de testuitslag van deze fabrikant.

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?

Mogelijke hinder door injectie op plek van inspuiten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Injectie van het vaccin.

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

Niet van toepassing

J. Humane eindpunten

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

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Licht, veroorzaakt door mogelijke hinder op plek van de injectie (zie I).

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 resultaten van de dierproef worden bepaald met serologie. De dieren worden aan het eind van de proef verbloed, waarbij de benodigde hoeveelheid bloed dusdanig is, dat de dood van de proefdieren onvermijdelijk is.

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

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

☒ Ja

4.

Format DEC-advies

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

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project: **Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus Vaccins**

3. Titel van de NTS: **Bepalen van de werkzaamheid van vaccins in het kader van Europese Vrijgifte door de overheid**

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

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: **DEC ALt**
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon: [redacted]**@intravacc.nl**

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC: **21-06-2017**
   - ☐ aanvraag compleet
   - ☐ in vergadering besproken: **06-07-2017**
   - ☐ anderszins behandeld
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot **06-07-2017/10-07-2017 20-7-2017 / 20-7-2017**
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   - ☐ aanpassing aanvraag
   - ☐ advies aan CCD: **24-07-2017**

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
   De IvD heeft de totstandkoming van deze projectaanvraag begeleid en kan met de projectaanvraag instemmen.

8. Eventueel horen van aanvrager
   - Datum: **06-07-2017**
   - Plaats: **Bilthoven**
   - Aantal aanwezige DEC-leden: **7**
   - Aanwezige (namens) aanvrager: **projectleider**
   - Gestelde vraag / vragen:
     Aanvrager is verzocht om de context van de aanvraag ten behoeve van de DEC nader toe te lichten.
   - Verstrekt(e) antwoord(en):

Aanvrager heeft een heldere presentatie gehouden en na afloop enkele informatieve vragen beantwoord.

- Het horen van de aanvrager heeft **niet** geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Naar aanleiding van het horen van de aanvrager zijn onderstaande vragen schriftelijk gesteld (punt A9).

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **06-07-2017**

Het projectvoorstel is helder omschreven. De DEC heeft slechts enkele opmerkingen:
1. De titel van het project is " Europese vrijgifte van vaccins", maar het gaat eigenlijk specifiek om difterie- en tetanusvaccins. Is het nog een idee om deze vaccins specifiek in de titel op te nemen?
2. Uit de presentatie bleek dat uw organisatie het controle laboratorium (OMCL) is. Uit de tekst valt dit niet op maken. Kan de tekst zo aangepast worden, dat dit wel duidelijk wordt?
3. De DEC adviseert om in het projectvoorstel onder punt 3.2 (Doel), laatste zin toe te voegen dat het project " … sinds 1999 *met succes* wordt uitgevoerd".
4. De DEC mist in de NTS onder de 3V's, dat met het oog op reductie slechts 1 op de 4 batches getest hoeft te worden en dat door de afspraken binnen het OMCL netwerk, één vaccin partij maar in één controle lab getest hoeft te worden, waarna de partij door de andere Europese landen geaccepteerd wordt en de diertest in deze landen niet herhaald hoeft te worden.

- Datum antwoord: **10-07-2017**
- Verstrekt(e) antwoord(en):

Ad 1. De titel is aangepast tot: "Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins", ook het type dierproef (3.4.4 en Bijlage Beschrijving Dierproeven) is aangepast tot "Serologische bepaling werkzaamheid DTP en Tetanus vaccins".
Ad 2. In het projectvoorstel is bij "3.1 Achtergrond" als laatste zin van de 3e alinea de zin "Onze organisatie is het OMCL van Nederland" opgenomen.
Ad 3. Suggestie overgenomen.
Ad 4. Aan 4.2 van de NTS zijn nu de volgende twee punten toegevoegd, waarvan het eerste nu ook in de Bijlage Beschrijving Dierproeven is opgenomen in sectie D:
- "Europese vrijgifte is een wettelijk systeem dat gebaseerd is op wederzijdse erkenning. Een partij vaccins die door een Europese lidstaat wordt vrijgegeven, mag niet meer door een andere lidstaat worden getest. Hierdoor is herhaaldelijk testen van partijen beëindigd."
- "Voor het DTP vaccin wordt, door aanwezigheid van een goedgekeurd 3R reductie schema, [redacted] (met een minimum van 1 per jaar)"

Aan 4.3 van de NTS is nu toegevoegd: "Verder zijn de gebruikte (serologische) methodes verfijningen van de klassieke zgn. (lethal) challenge methodes."

- Datum: **20-07-2017**

De antwoorden en de aangepaste documenten zijn beoordeeld tijdens de schriftelijke ronde van de DEC van juli 2017. Naar aanleiding hiervan heeft de DEC nog één suggestie, nl. om de NTS bij punt 4.3 aan te passen. Hier wordt nl. gevraagd om de keus van het diersoort te verklaren en deze verklaring staat niet in de tekst. Verder is de zin "Verder zijn de gebruikte (serologische) methodes verfijningen van de klassieke zgn. (lethal) challenge methodes." niet echt lekentaal; de DEC stelt voor om deze zin eruit halen.

- Datum: **20-07-2017**
- Verstrekt(e) antwoord(en):

De zin bij 4,3 is verwijderd en de volgende zin opgenomen:
"De werkzaamheidsonderzoeken worden uitgevoerd in muizen, omdat deze diersoort opgenomen is in de registratiedossiers van de DTP en tetanus vaccins."

- **De antwoorden zijn akkoord bevonden door de DEC.**
- De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**

3. De DEC is competent om over dit project te adviseren.

4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een helder omschreven doelstelling en het is duidelijk hoe de verschillende onderdelen binnen het project met elkaar samenhangen en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling. De opzet komt goed overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondervinden.

2. Voor zover de DEC ALt weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proeven beschreven in dit projectvoorstel in de weg zou kunnen staan.

3. De in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie (Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie) sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om te bevestigen dat de geproduceerde partijen difterie tetanus polio (DTP) en tetanusvaccin voldoen aan de werkzaamheidseisen die het registratiedossier en de Europese Farmacopee aan deze producten stellen.
   Na productie wordt door producenten voor elke partij vaccin de werkzaamheid bepaald met behulp van de diermodellen beschreven in het registratiedossier van het vaccin. Daarnaast geldt de verplichting tot 'vrijgifte van vaccins door de overheid'. Hieronder valt een controle door een nationaal controle laboratorium (Official Medicines Control Laboratory (OMCL)) om te bevestigen dat een vaccin partij voldoet aan de eisen die in het registratiedossier en de Europese Farmacopee zijn vastgelegd. Voor sommige vaccins bestaat er de eis dat de diertest ook uitgevoerd wordt door een OMCL om op een onafhankelijke manier te bevestigen dat de partij voldoet aan de gestelde eisen. Voor de in dit project beschreven vaccins –difterie en tetanus – geldt dat van elk vaccin één partij per jaar gecontroleerd wordt op werkzaamheid.

Indien de vaccins voldoen aan de gestelde eisen, kunnen deze toegelaten worden voor vaccinatie. Daarmee wordt met dit project een bijdrage geleverd aan het waarborgen van de volksgezondheid (het uiteindelijke doel).

De DEC is van mening dat er een heldere relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden binnen dit onderzoek zijn de proefdieren, de onderzoekers en de burgers/de samenleving. De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en de dieren kunnen licht ongerief ondervinden als gevolg van de vaccinatie. Na afloop van het experiment zullen de dieren onder anesthesie worden gedood voor het verkrijgen van het bloed. Het bloed wordt gebruikt om de immunologische reacties van de dieren te bepalen. Voor de onderzoekers is het slechts beperkt van belang om dit onderzoek te kunnen doen. In de afweging behoren de belangen van individuele onderzoekers, naar het oordeel van de DEC, ook geen rol te spelen. Voor de burgers/de samenleving is het van belang, dat de overheid onafhankelijk toezicht houdt op de werkzaamheid van geproduceerde vaccins.

6. De aanvrager geeft niet aan onbedoelde negatieve effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen redenen om aan te nemen dat die er wel zullen zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van dit instituut en de betrokken bedrijven zijn voldoende gewaarborgd. De aanvragers hebben jarenlange ervaring met het testen en vrijgeven van vaccins. De DEC is dan ook van mening dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende is om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.

8. De doelstelling van het project is helder uiteengezet en de voorgestelde experimenten sluiten hier goed bij aan. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet en dat jarenlange ervaring voldoende garandeert dat deze experimentele aanpak zal leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

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

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

11. De aanvragers hebben het cumulatief ongerief van de muizen geschat op licht. Het ongerief dat de muizen ondervinden wordt veroorzaakt door de vaccinatie en de anesthesie voor de euthanasie. De muizen ondervinden mogelijk licht ongerief van de injectie. Naar mening van de DEC is het cumulatieve ongerief, licht, als gevolg van de dierproeven juist ingeschat en geclassificeerd.

12. De integriteit van de muizen wordt in beperkte mate aangetast door de beperking van vrijheid en natuurlijk gedrag.

13. Op basis van ervaring, voorzien de aanvragers dat er zich geen omstandigheden voor zullen doen, waarbij het toepassen van humane eindpunten noodzakelijk is. De DEC is van mening dat dit een juiste inschatting is.

3V's

14. Alhoewel er gewerkt wordt met (en aan) *in vitro* methoden, is een levend/intact dier noodzakelijk om immunologische responsen te bepalen en daarmee de werkzaamheid van het vaccin te controleren. De DEC is van mening er op dit moment geen geaccepteerde alternatieven voorhanden zijn. De aanvragende instelling is echter nauw betrokken bij het verder ontwikkelen van alternatieven op het Europese platform. en zou in die hoedanigheid actief moeten zijn in het implementeren van in vitro methoden waar dat mogelijk is. Het projectvoorstel betreft het testen van de werkzaamheid van DT-IPV en T vaccins [redacted] voor de [redacted]. Deze situatie leent zich in de optiek van de DEC bij uitstek om als OMCL in samenwerking met de producent te bestuderen of actieve implementatie van reeds bestaande en nu nog in ontwikkeling zijnde in vitro methoden voldoende garanties kunnen gaan bieden om het dierexperimenteel onderzoek op zo kort mogelijke termijn te vervangen. Het is de inschatting van de DEC dat op dat punt in de komende vijf jaar belangrijke stappen gezet zouden kunnen worden.

15. De onderzoekers hebben verschillende initiatieven ontplooid om te komen tot vermindering van het gebruikte aantal dieren per proef. Oorspronkelijk werden er voor beide testen voor zowel difterie als tetanus [redacted] dieren per groep gehanteerd, dit is op grond van achteraf uitgevoerde berekeningen met de resultaten van voorgaande proeven (empirisch) teruggebracht naar [redacted] dieren per groep voor tetanus en [redacted] per groep voor difterie. Daarnaast wordt er een reductie schema toegepast waardoor maar [redacted] partijen getest hoeft te worden. Voor tetanus vaccin wordt een single dilution assay gebruikt (zie ook Europese Farmacopee monografie 2.7.8). Hierdoor wordt er slechts één verdunning per vaccin ingezet hetgeen proefdieren bespaart ten opzichte van een multi dilution assay [redacted]). Ook zorgt het Europe vrijgifte systeem ervoor dat wanneer een partij door één OMCL gecontroleerd is deze partij ook geaccepteerd wordt in de andere aangesloten lidstaten. Hiermee wordt voorkomen dat de partij opnieuw getest moet worden. De onderzoekers geven aan dat verdere vermindering op dit moment niet mogelijk is, maar gedurende de loop van het project niet uitgesloten wordt. De DEC is van mening dat het maximaal aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat is op basis van ervaring uit het verleden en dat het een reële inschatting is voor de aankomende jaren en dat het proportioneel is ten opzichte van de opzet en de doorlooptijd van het project.

16. Het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Op basis van de jarenlange ervaring valt niet te verwachten dat de dieren meer dan licht ongerief zullen ondervinden van de vaccinatie en/of de anesthesie voor de euthanasie. De DEC is dan ook van mening, dat de beschreven experimentele opzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft routinematige controle van vaccins t.b.v. de uitvoering van wettelijk verplicht vrijgifte van vaccins. De test van het Rijkscontrolelaboratorium zou als een herhaling gezien kunnen worden van de test van de producent, maar is wettelijk verplicht als controle van de testuitslag van deze fabrikanten. Het is overigens niet zo dat het OMCL alle dierproeven van de producent opnieuw doet. Het betreft uitsluitend de test die het meest relevant wordt geacht met het oog op het vrijgeven van het vaccin.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal gebruik maken van één geslacht per test. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: "De reden om slechts een sexe te gebruiken is dat beide testen zijn gevalideerd met één geslacht per test en zo ook altijd zijn uitgevoerd. Op basis van deze historische testen zijn de groepsgroottes teruggebracht tot het empirisch minimum (zie C15). Overgang op gelijk gebruik van beide sexes zou gevalideerd moeten worden, omdat dit consequenties kan hebben voor de spreiding binnen groepen en daarmee voor de einduitslag. Een dergelijke validatie zal veel extra gebruik van proefdieren betekenen." (Ongeveer 30%). Weliswaar wordt één geslacht per test gebruikt, maar in de praktijk zullen afwisselend testen met mannelijke en vrouwelijke dieren gedaan worden (afhankelijk van wat de fokker op voorraad heeft). Hiermee wordt het gebruik van beide geslachten gegarandeerd en een fokoverschot zoveel mogelijk voorkomen. De DEC meent dat het opnieuw valideren van de test met beide geslachten een onnodige toename van het aantal dieren met zich meebrengt. De DEC is dan ook van mening dat de aanvrager in voldoende mate onderbouwd heeft waarom gekozen is voor het gebruik van één geslacht per test.

19. De dieren zullen worden gedood met een dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doding is noodzakelijk om het bloed te verkrijgen waarin parameters gemeten worden die indicatief zijn voor de immunologische responsen geïnduceerd door de vaccins.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van het verkrijgen van de onafhankelijke extra bevestiging dat de geproduceerde partijen difterie- en tetanusvaccin voldoen aan de werkzaamheidseisen die het registratiedossier en de Europese Farmacopee aan deze producten stellen (directe doel) en daarmee een bijdrage kunnen leveren aan het waarborgen van de volksgezondheid (uiteindelijke doel), het ongerief dat de dieren zullen ondervinden en de integriteits-aantasting van de dieren?

2. De integriteit en het welzijn van de dieren worden in dit project in lichte mate aangetast (zie C9 tot C20). Daar staat tegenover dat dit project bijdraagt aan het garanderen van de werkzaamheid van de vaccins en aan het vergroten van het vertrouwen van de burgers/de samenleving in werkzame vaccins en aan het waarborgen van de volksgezondheid. Dit dient zowel een groot economisch belang als een groot volksgezondheidsbelang. De DEC kent daar veel gewicht aan toe.

3. De DEC is overtuigd van het belang om te bevestigen dat de geproduceerde partijen difterie- en tetanusvaccin voldoen aan de werkzaamheidseisen die het registratiedossier en de Europese Farmacopee aan deze producten stellen (directe doel) en het kunnen waarborgen van de volksgezondheid (uiteindelijke doel), en vindt dat de kennis en kunde van de aanvragers het aannemelijk maakt dat deze doelstellingen behaald worden binnen de looptijd van het project. De DEC is tevens van mening dat de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er thans geen alternatieven voorhanden zijn, dat het aantal dieren realistisch is ingeschat en dat het project in overeenstemming is met de vereisten voor verfijning van dierproeven.

Alles afgewogen mag geconcludeerd worden dat het belang van de doelstellingen en de haalbaarheid van het project, het lichte ongerief dat de dieren ondervinden als gevolg van vaccinatie en de anesthesie en de geringe aantasting van de integriteit van deze dieren, kunnen rechtvaardigen. Aan de eis, dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
   X **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

2. Het uitgebrachte advies is unaniem tot stand gekomen.

3. Het volgende punt is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies. De DEC acht het van belang dit te signaleren.

   De aanvragende instelling is nauw betrokken bij het verder ontwikkelen van alternatieven voor de onderhavige wettelijk verplichte dierexperimenten op het Europese platform en zou in die hoedanigheid actief moeten zijn in het implementeren van in vitro methoden waar dat mogelijk is. Dit projectvoorstel betreft het testen van de werkzaamheid van DT-IPV en T vaccins van [redacted] voor [redacted] (toelating van de vaccins op de markt in andere Europese landen en wederzijdse acceptatie van testen, spelen derhalve geen rol). Deze situatie leent zich in de optiek van de DEC bij uitstek om [redacted] in samenwerking met de producent te bestuderen of actieve implementatie van reeds bestaande en nu nog in ontwikkeling zijnde in vitro methoden voldoende garanties kunnen gaan bieden om het dierexperimenteel onderzoek op zo kort mogelijke termijn te vervangen. Het is de inschatting van de DEC dat op dat punt in de komende vijf jaar belangrijke en zelfs beslissende stappen gezet zouden moeten kunnen worden.
   De DEC wil er wel nadrukkelijk nog eens op wijzen dat er op dit moment geen geaccepteerde alternatieven zijn voor de testen waarvoor vergunning wordt gevraagd.

Centrale Commissie Dierproeven

5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Institute for Translational Vaccinology
[redacted]
Postbus 450
3720 AL BILTHOVEN

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
AVD3260020172726

Bijlagen
2

Datum 25 juli 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 juli 2017. Het gaat om uw project "Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD3260020172726. 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.

Datum:
25 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172726

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
25 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172726

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	32600
Naam instelling of organisatie:	Institute for Translational Vaccinology
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
Straat en huisnummer:	Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
Postbus:	450
Postcode en plaats:	3720 AL BILTHOVEN
IBAN:	NL741NGB0705003612
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	PD ALt

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
25 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172726

Gegevens gemachtigde

Naam:	[redacted]
Postbus:	450
Postcode en plaats:	3720 AL BILTHOVEN

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 oktober 2017
Geplande einddatum:	1 oktober 2022
Titel project:	Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins
Titel niet-technische samenvatting:	Bepalen van de werkzaamheid van vaccins in het kader van Europese Vrijgifte door de overheid
Naam DEC:	DEC ALT
Postadres DEC:	Postbus 450 [redacted] 3720 AL Bilthoven
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.035,-
De leges voldoet u:	na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Bilthoven
Datum:	24 juli 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Institute for Translational Vaccinology
[redacted]
Postbus 450
3720 AL BILTHOVEN

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
AVD3260020172726

Bijlagen
2

Datum 25 juli 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 25 juli 2017
Vervaldatum: 24 augustus 2017
Factuurnummer: 172726

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD3260020172726	€ 1.035,00

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

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Institute for Translational Vaccinology
[redacted]
Postbus 450
3720 AL BILTHOVEN

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
AVD3260020172726

Datum 11 augustus 2017
Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 24 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins" met aanvraagnummer AVD3260020172726. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

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

Onduidelijkheden
U beschrijft dat u de testen zult uitvoeren volgens de Europese Pharmacopee, en u gebruikt hiervoor een model wat minder ongerief met zich meebrengt. Wij juichen dit uiteraard toe. Echter, deze assay wordt in de EP beschreven voor cavia's, niet voor muizen. Kunt u uitleggen waarom u deze assay niet in cavia's uitvoert en bevestigen dat de assay in muizen door de regulatoire instanties ook wordt geaccepteerd?
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:
11 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD3260020172726

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

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

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: Institute for Translational Vaccinology

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD3260020172726

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:
AVD3260020172726

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

7.

Instantie voor Dierenwelzijn (IvD ALt)
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9
[redacted]
Postbus 450
3720 AL Bilthoven
[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Bilthoven, 21 augustus 2017

Betreft: **Antwoord op vraag CCD inzake project AVD3260020172726**

Geachte leden CCD,

In uw brief van 11 augustus jl. verzoekt u om extra informatie inzake projectaanvraag AVD3260020172726.

Uw vraag luidde als volgt:

Onduidelijkheden

U beschrijft dat u de testen zult uitvoeren volgens de Europese Pharmacopee, en u gebruikt hiervoor een model wat minder ongerief met zich meebrengt. Wij juichen dit uiteraard toe. Echter, deze assay wordt in de EP beschreven voor cavia's, niet voor muizen. Kunt u uitleggen waarom u deze assay niet in cavia's uitvoert en bevestigen dat de assay in muizen door de regulatoire instanties ook wordt geaccepteerd?
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

De projectleider van deze projectaanvraag heeft uw vraag als volgt beantwoord:
“Het klopt dat de EP voorschrijft dat deze testen uitgevoerd worden met cavia's. Voor geneesmiddelen (en dus ook voor vaccins) is het registratiedossier leidend. Wanneer er in de productie of testen afgeweken wordt van de EP, moet dat door de registratieautoriteiten (voor deze vaccins: het College ter Beoordeling van Geneesmidelen) goedgekeurd worden. Voor zowel DTP als Tetanus Vaccin is in de (goedgekeurde) registratiedossiers de muis vastgelegd als proefdier in de tetanus en difterie werkzaamheidstesten, en niet de cavia. Er is dus geen twijfel dat de regulatoire instanties de keuze voor de muis (in plaats van de cavia) in deze assays accepteren.
Aangezien wij als rijkscontrole laboratorium toezicht houden op de vaccinfabrikant (en toetsen of productie en testen voldoen aan het registratie dossier), gebruiken wij ook de muis.”

Wij hopen dat uw vraag hiermee voldoende is beantwoord.

Met vriendelijk groet,

[redacted],
[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

8.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Institute for Translational Vaccinology
[redacted]
Postbus 450
3720 AL BILTHOVEN

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
AVD3260020172726
Bijlagen
1

Datum 12 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 24 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins" met aanvraagnummer AVD3260020172726. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 22 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. In antwoord op onze vraag heeft u verhelderd dat de studie in muizen is vastgelegd in de goedgekeurde registratiedossiers.

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 "Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een aanvraag een maximale looptijd van 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC ALt gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 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]
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:	Institute for Translational Vaccinology
Adres:	Postbus 450
Postcode en plaats:	3720 AL BILTHOVEN
Deelnemersnummer:	32600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Europese Vrijgifte van DTP en Tetanus vaccins" met aanvraagnummer AVD3260020172726, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC ALT. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Wetenschappelijk medewerker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 juli 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 juli 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 juli 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 juli 2017, ontvangen op 26 juli 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 22 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Serologische bepaling werkzaamheid DTP en Tetanus vaccins				
	Muizen (Mus musculus) /	936	Licht	

Voorwaarden

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

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

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

Aanvraagnummer:
AVD3260020172726

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD3260020172726

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.

2744

1.

Centrale Commissie Dierproeven

27 JUL 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* 11500
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	30244197

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

Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Postbus	12007
Postcode en plaats	3501AA Utrecht
IBAN	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☒ Dhr. ☐ Mw.
Functie	Associate Professor
Afdeling	Experimental Cardiothoracic and Vascular Surgery
Telefoonnummer	+31-887558662
E-mailadres	[redacted]

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

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 9 - 2017
		Einddatum	1 - 9 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Evaluatie van een bioafbreekbare graft voor bypass operaties	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035.- Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☒ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam [redacted]

Functie

Plaats Utrecht

Datum 25 - 7 - 2017

Handtekening

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3	Provide the title of the project.	Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model

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.

This study investigates the biocompatibility of a novel vascular graft made of a bioabsorbable synthetic material to be used in patients who undergo bypass surgery. A common cardiovascular disease is coronary artery disease (CAD). It is considered a major public health problem and leads to high numbers of morbidity and mortality [1,2]. CAD becomes more prevalent with age, as well as with an unhealthy

diet, overweight, and smoking [1]. The first line of treatment is catheter based minimally invasive angioplasty (re-canalization of the narrowed coronary artery with a distending balloon with subsequent placement of a stent in the opened blood vessel) However, when the treated segments of coronary arteries become stenotic again when atherosclerotic disease progresses, or in case multiple severely stenosed coronary arteries are present at first angiographic investigation, a coronary artery bypass graft (CABG) surgery is indicated. The majority of patients need more than 1 bypass as they suffer from several blockages of the coronary arteries, and therefore frequently need triple or quadruple bypass surgeries. Consequently, it increases the needed number of conduits to be harvested. In traditional CABG surgery, autologous vessels are used as the conduit around the blocked coronary artery. Examples of commonly used conduits are the internal mammary artery (IMA, taken from the inside of the chest), the radial artery (RA, taken from lower arm) and the saphenous vein graft (SVG, taken from the leg).

The main limitation in patients that need triple or quadruple bypass surgeries is the availability of sufficient length of autologous vessels to be used as bypass conduit. First of all because there is need for 3 or more separated bypass conduits. Secondly SVG might not be useful as a bypass conduit due to inherent disease like varicosis, where vessels are enlarged and therefor unable to use. Unavailability of conduit material may occur owing to previously harvest for bypass operations in the past [3]. The preferred conduits for CABG are IMA's, which have shown excellent patency over many years (defined as bypass was functional with widely open connection between bypass conduit and coronary artery). In case more coronary bypasses are needed, the harvested SVG can be cut into pieces of desired length. However, it is shown that use of SVG result in lower patency rates compared to IMA's. [4]. The availability of commercial off-the-shelve synthetic grafts with small diameter (Ø 1.5-5 mm) may overcome the shortage of bypass conduits. However, these polymer conduits are hardly used clinically due to early graft failure. Their high stiffness creates a mismatch in the mechanical properties of the grafts and the recipient native blood vessels [5]. Stiffness makes it complicated to create a perfect anastomosis between conduit and the coronary artery, which creates unfavorable flow disturbances. For these reasons, synthetic conduits are known to occlude earlier compared to autologous SVG [6]. Furthermore, the synthetic conduits, once implanted, are there to stay because the body is unable to break down the chemical structure of the wall of the implanted artificial blood vessel. This may give rise to an unfavorable chronic host *vs* graft inflammatory response. Finally, the overall biocompatibility of these polymer conduits proved inferior to SVG.

We are developing a vascular graft made of a bioabsorbable material. After implantation of the vascular graft, the graft will slowly start to absorb, while at the same time, new tissue will be formed that will take over the function of this implanted graft (primary function is the conduct of blood flow in a pressure resistant conduit). We aim that the patient finally ends up having a new, living, autologous vessel to be functional as conduit. Furthermore, the use of this material has the potential to be a bypass conduit without limitations in terms of graft failure (owing to stenosis, occlusion and calcification) beyond that of the presently available autologous veins or commercial products.

Research preceding this proposal. Both in-vitro work and recent acute in-vivo work (also in sheep) were performed before the start of performed other chronic experiments to assess the feasibility, bendability, and suturability of the absorbable grafts. It has been shown that both straight and bendable grafts could be produced, which can be sutured onto the native vessels. Handling, trimming and suturability were assessed and approved by different surgeons using questionnaires. In addition, it was shown that acute patency could be obtained in vascular grafts (diameter [redacted]) that served as a bypass of the left and right internal mammary arteries, when anticoagulation was administered to the animals (data not published yet). Other acute in-vivo studies showed that the absorbable grafts can be used to create a full CABG. Here, a bypass was created from the aorta towards the left circumflex artery. Again, the graft stayed patent for the follow-up time [redacted]. Chronic in-vivo work in the ovine model, where absorbable grafts (with a diameter of [redacted], high flow bypass) were used as an interposition of the carotid artery of sheep have been shown that all grafts remained patent up to [redacted] months. No signs of thrombus formation, stenosis, calcification or severe inflammation were found, which indicates that the material is biocompatible in high flow bypass conditions [redacted]) (data not published yet). In CABG, however, blood flow is in the range of [redacted]/min and graft diameter is smaller, with diameter of [redacted] In the current study, we will investigate small diameter (curved) conduits with

comparable length to human implants. Due to the lower flow and the smaller diameter, it is needed to perform new animal studies. As the diameter is smaller, a new layer of tissue with the same thickness as in a larger diameter has a bigger effect on patency. In addition, smaller diameter grafts are more difficult to handle compared to large diameter grafts as there is less space for the surgeon to work around.
In general, it has been shown that there is a good balance between tissue formation and material degradation. In both [redacted] studies up to [redacted] (data not published yet) and [redacted] studies up to [redacted] (data not published yet) the tissue was formed before the material was degraded. This is an important safety aspect, as the newly formed tissue has to take over the function of the implanted material.

1. Go A.S. *et al.* (2014) Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **129**(3), e28-e292
2. Nichols M. *et al.* (2013) Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update. *Eur.Heart J.* **34**(39), 3028-3034
3. Bordenave L. *et al.* (2008) Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes. *Expert.Rev.Med.Devices* **5**(3), 337-347
4. Goldman S. *et al.* (2004) Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study. *J.Am.Coll.Cardiol.* **44**(11), 2149-2156
5. Catto V. *et al.* (2014) Vascular Tissue Engineering: Recent advances in small diameter blood vessel regeneration. *ISRN Vascular medicine* **2014**, -1.
6. Pashneh-Tala Tissue Eng Part B Rev. 2016 Feb 1; 22(1): 68–100.

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 final goal of the project is to assess whether absorbable grafts can be used as a commercially available off-the-shelf bypass graft. Therefore, these grafts should be fully biocompatible. Consequently, conduits should stay patent and should not show signs of fibrosis or severe calcification, which is a process of early ageing and often observed with time. In addition, patients with these grafts should not be in need of vitamin K dependent anticoagulation therapy. The graft should fit in human anatomy in terms of length, routing and bendability. Furthermore, the conduit should be supple, should not kink and have the same handling features as vein grafts. The conduit must accommodate to the full length of the bypass (e.g. length between aorta anastomosis and connection to coronary target site beyond the proximal coronary occlusion).

Proposed chronic studies

In chronic study 1, an interposition graft will be sutured between the distal left internal mammary artery (LIMA) and the left anterior descending (LAD) artery. The LIMA will be harvested and an anastomosis between the LIMA and the absorbable graft will be made. Thereafter, the graft is anastomosed to the LAD. The LAD, proximal of the graft anastomosis, will be ligated to route blood flow to the distal myocardium exclusively through the bypass. Using this set-up, a short straight graft of a couple of cm is employed, without the need to curve the graft. This protocol will provide insight on the biocompatibility (thrombosis, tissue formation, calcification, inflammation) and functionality (bypass flow) under predominantly diastolic flow in a straight polymer bioabsorbable graft as interposed between arteries. In addition, information on the distal anastomotic geometry (graft connection to LAD, end-to-side anastomosis) will be collected, while data on the proximal end-to-end anastomosis will be collected.

In chronic study 2, a bypass will be created between the aorta and the left circumflex coronary artery that mimics the clinical situation (SVG aorto-coronary bypass = translational step). The left circumflex coronary artery, proximal of the graft anastomosis, will be ligated to route blood flow to the myocardium

exclusively through the bypass. To adapt to local anatomy the graft needs to be bendable to allow a curved route and to be of sufficient length. Using this method, information can be collected on the biocompatibility (thrombosis, tissue formation, calcification, inflammation) and functionality (bypass flow) using long and bended grafts, again under predominantly diastolic flow. In addition, both proximal anastomotic geometry (end-to-side aorta to conduit) and the distal anastomoses will be studied.

The major read-outs of both chronic studies are focussed on functionality and biocompatibility, respectively. Functionality is assessed by: bypass flow, echocardiography (heart viability and wall motion), angiography (run-off of contrast agent, patency of grafts, presence of obstructing thrombus). Biocompatibility is assessed by: macroscopic and microscopic evaluation of the grafts. It provides histologic data on tissue formation and deposition, calcification, inflammation, thrombus formation, and scaffold degradation (absorption rate, dilatation and/or aneurysm of the synthetic scaffold/grafts).
To further assess tissue formation and degradation of the grafts over time, the grafts will be explanted after different time points.
In addition, the morbidity and mortality of the animals will be monitored based on health status during the whole study, and blood analysis including standard haematology, haemostasis and clinical chemistry.

3.3 Relevance

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

The use of absorbable material in bypass surgery instead of autologous veins or currently commercial available non-absorbable products, will eventually lead to a blood conduit as a new living vessel with no limitations in terms of stenosis beyond that of the presently available alternatives. The strategy will improve life of patients (no wounds in legs, no SVG harvested, and therefore no risk on reduced blood circulation in the leg) and reduce costs in health care, due to the durability of the grafts, resulting in a reduction in additional treatments. In addition, these new absorbable grafts can be readily available off-the-shelf in different sizes and lengths.

3.4 Research strategy

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

Polymeric bioabsorbable vascular grafts will be implanted, using both two above described chronic studies, into 60 sheep (n=30 per study) to determine the biocompatibility and functionality. Sheep are chosen as preferred animal model because they closely mimic human anatomy and physiology. Secondly, sheep are commonly used for research on cardiovascular devices, and is an established published model [7, 8]. The animal model allows the implantation of clinical sized bypass conduits using standard surgical procedures. It is presenting a worst-case model due to rapid calcification of the vessels in sheep compared to other models and is accepted by the American Food and Drug Administration for research on cardiovascular products. Favorable results in the sheep model may preclude safety, desired biocompatibility and functionality in humans.
Each study contains 30 animals, with a total of 60 animals together. In each study, n=10 animals at each time point (3, 6, and 12 months) will be killed. Animals will be follow-up up to 12 months, as this will allow to obtain information on the long-term functionality of the implanted grafts. It has been observed that the material is not fully absorbed after 12 months, however, it has also been shown that the functionality of the graft material mostly has been taken over by the tissue after 6 months. 12 months follow-up will provide information on whether the newly formed tissue is remodelled into a fully functional blood vessel. In addition, 12 months will be more than sufficient to observe whether thrombus formation will occur, which is a risk of clotting of the vessels. We have observed that after 6 months (carotid study) the implanted vessels were fully endothelialized, reducing the risk of thrombus formation. The sheep model is a good model for this, as no spontaneous endothelialization is occurring, which can be the case in pigs or dogs. Therefore, the sheep model mimics best what will happen in the human situation.
Animals can die due to graft related or due to non-graft related issues, what is taken into account when determining the number of animals. Motivation for number of animals see Appendix A ’Experimental approach and primary outcome parameters’.

7. Ali et al, Cardiovascular surgery,1996;4(4):543-549
8. Shofti et al, Lab Anim. 2004 Apr;38(2):149-57.

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.

After implantation and before killing of the animal and during follow-up, transthoracic echography and angiography will be performed. See Appendix A 'Experimental approach and primary outcome parameters' for the details on time points when these procedures will take place. Angiography will be performed to assess the patency of the graft, the flow patterns, the diameter of the graft and the dimensions of anastomotic orifice. Echography will provide information on the function of the heart typically related to the graft perfused territories. Blood samples will be taken at several time points (by puncture of the jugular vein). In addition, a weekly health check will be monitored.

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 same material as used in the preceded research will be used in described chronic studies 1 and 2. It provided insight in technical possibilities and implantation techniques to be used in studies 1 and 2.
Main expected outcome chronic study 1: biocompatibility and functionality focussed on a straight small diameter bioabsorbable conduit and distal coronary anastomosis at different time points in a CABG sheep model (see further Appendix A 'Experimental approach and primary outcome parameters')
Main expected outcome chronic study 2: biocompatibility and functionality focussed on a curved small diameter bioabsorbable conduit and proximal aortic anastomosis at different time points in a CABG sheep model (see further Appendix A 'Experimental approach and primary outcome parameters').

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	Bypass implantation
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	Evaluatie van een omleidingsvat gemaakt van een bioafbreekbaar materiaal voor bypass operaties
1.2	Looptijd van het project	2 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Bioafbreekbaar, bypass, hartomleiding, kransslagader

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)

De doelstelling van het project is het testen van een bioafbreekbaar bloedvat in een relevant diermodel ten behoeve van bypass (of hartomleidings) operaties. Een veelvoorkomende ziekte aan het hart- en vaatstelsel is coronaire hartziekte. Dit is een aandoening waarbij de kransslagader, welke het hart van bloed voorziet, verstopt is. Hierdoor wordt de bloedtoevoer naar het hart belemmerd, wat kan resulteren in ernstige en vaak ook levensbedreigende situaties. Een hartomleidings operatie, waarbij eigen bloedvaten kunnen worden gebruikt als een omleiding van de verstopte kransslagader is dan een mogelijke optie. Veel van deze patienten hebben

meer dan een enkele verstopping, en hebben daardoor ook meerdere bloedvaten nodig. De voornaamste beperking in patienten die meerdere omleidingen nodig hebben is de beschikbaarheid van gezonde bloedvaten.

Het doel van de voorgestelde studie is om bloedvaten, welke gemaakt zijn van een afbreekbaar polymeer, te testen als alternatief voor de hedendaagse middelen die gebruikt worden tijdens een bypass operatie. Het afbreekbare bloedvat zal langzaam afbreken terwijl er tegelijkertijd nieuw weefsel wordt gevormd dat dit afbreekbare bloedvat vervangt. Na verloop van tijd beschikt de patient over een nieuw gevormd bloedvat met de eigenschappen van natuurlijke bloedvaten, welke minder snel zullen verstoppen dan de hedendaagse commerciele beschikbare middelen. Een ander voordeel is dat deze omleidingsvaten vooraf, en in verschillende maten, gemaakt kunnen worden, zodat ze per direct beschikbaar zijn voor elke patient.

De studie richt zich op een volledige omleiding, waarbij geen enkel bloedvat van het schaap zelf gebruikt wordt. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een buigbaar bioafbreekbaar bloedvat. Er wordt een omleiding aangelegd vanaf de aorta naar de kransslagaderin het hart, welke het hart van bloed voorziet. Dit geeft inzicht in de verbinding tussen de bloedvaten van het schaap zelf (de aorta en de kransslagader) en de bioafbreekbare vaten. Ook levert het data over de snelheid waarmee het nieuwe bloedvat afbreekt, en hoe en welk soort weefsel er gevormd wordt.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Tijdens deze studie zal er gekeken worden naar de functionaliteit van deze polymere omleidingsvaten. Deze vaten zullen door het lichaam bekleed worden met lichaamseigen weefsel. Na verloop van tijd is het omleidingsvat omgezet tot een geheel lichaamseigen bloedvat. Dit maakt de kans op afstoting erg klein, en draagt bij aan de duurzaamheid door bijvoorbeeld verminderd risico op complicaties zoals verstoppingen. Verder zullen ook de weefselvorming en de snelheid waarmee het omleidingsvat afbreekt onderzocht worden. Dit zal verder bijdragen aan de ontwikkeling van deze bioafbreekbare bloedvatbeschikbaarheid van omleidingsvaten. Het voordeel van bioafbreekbare vaten ten opzichte van de hedendaags beschikbare vaten is dat de patient zijn eigen vaten kan behouden en daardoor minder wonden zal hebben in het been, daar waar anders een bloedvat geoogst dient te worden. Dit zou tevens kunnen resulteren in risico op complicaties (bijv. slechte circulatie in het been). Ook zullen de kosten voor de gezondheidszorg verminderen vanwege de duurzaamheid van de bloedvaten, de te verwachten minder aantal re-operaties en heropnames wat resulteert in een vermindering van het aantal behandelingen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Schapen, Swifter ras, volwassen, aantal=60
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het	Als gevolg van de operatie zullen de dieren pijn aan de wond hebben, echter zal deze onderdrukt worden met behulp van pijnstillers. Daardoor zijn de negatieve gevolgen voor de dieren minimaal.

	welzijn van de proefdieren?	Tijdens het verloop van de studie zullen er op verschillende tijdspunten niet-belastende technieken gebruikt worden, waarbij er aangetoond kan worden dat de bloedvaten open zijn. Deze ingreep gebeurd onder een lichte narcose. Om het ongerief zoveel mogelijk te beperken zal deze ingreep maximaal 7 keer uitgevoerd worden. Ook zullen er beelden van het hart gemaakt worden om de functionaliteit van het hart te monitoren.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Ernstig
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden onder nacrose gedood. Het is noodzakelijk om de dieren te doden omdat we behalve de graft, ook willen bekijken of er negatieve effecten worden gevonden in de organen van de dieren.

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.	Voor deze studie is het noodzakelijk om dieren te gebruiken, aangezien de functionaliteit van het afbreekbare bloedvat alleen getest kan worden in een omgeving met bloed met daarin allerlei complexe componenten zoals levende cellen welke zowel het weefsel aanmaken als de graft afbreken.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Voorafgaand aan deze studie zijn er de noodzakelijke testen in het laboratorium uitgevoerd op het afbreekbare bloedvat. Er is gekeken welk materiaal het beste gebruikt kan worden, hoe snel het afbreekt in het laboratorium, en er is getest met het maken van omleidingen met behulp van dit materiaal op cadavers. Door dit eerst uit te voeren in het laboratorium hebben we veel dieren kunnen besparen en is er nu maar een relatief kleine groep nodig om het materiaal ook in levende dieren te testen. De technische uitvoerbaarheid van de operatie is getest op zowel kadavers als op dieren onder narcose. Hierbij is er al aangetoond dat het mogelijk is om de bloedvaten op een goede manier te kunnen plaatsen in het dier. [redacted] Doordat al deze testen grondig uitgevoerd zijn, hebben we nu niet veel schapen nodig om de onderzoeken uit te voeren met kleine diameter

		omleidingsvaten en lage bloedstroom vergelijkbaar met de menselijke bypass operatie. Met deze voorbereidende studies hebben we meer zekerheid dat het voorliggendeonderzoek zal slagen.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De keuze voor het schapenmodel is gemaakt omdat dit een veelgebruikt model is voor de evaluatie van veiligheid en functionaliteit van producten die bloedvaten en hartkleppen vervangen. Schapen zijn hier erg geschikt voor omdat de anatomie erg lijkt op die van mensen. Pilot proeven op schapen zijn uitgevoerd om de technische uitvoerbaarheid te bepalen. Tijdens de studie zullen er op verschillende tijdspunten niet-belastende technieken gebruikt worden, waarbij er aangetoond kan worden dat de bloedvaten open zijn. Deze ingreep gebeurd onder een lichte narcose. Om het ongerief zoveel mogelijk te beperken zal deze ingreep maximaal 7 keer uitgevoerd worden.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	De operatie zal steriel worden uitgevoerd, wat het risico op infecties zal verlagen. Na de operatie zullen de dieren intensief in de gaten worden gehouden, vergelijkbaar met een open-hart operatie bij humane patienten. Pijn- en infectiebestrijding wordt gegeven tijdens de eerste dagen na de operatie. Hierna zijn er geen negatieve gevolgen voor de dieren meer te verwachten. Direct na de operatie zullen de dieren kort alleen gehuisvest worden om ze zo goed mogelijk te kunnen verzorgen. Zodra ze voldoende opgeknapt zijn (binnen enkele dagen) zullen ze weer gehuisvest worden in groepen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

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.

1

General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number: 1 Type of animal procedure: Bypass implantation

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.
Preceded research. In-vitro studies and acute in-vivo have been performed to assess the usage of medication to improve the patency of absorbable grafts. It has been shown that the use of anti-coagulation

and anti-thrombus medication prior to surgery improved the outcome (patency). It was shown that grafts did not occlude and showed good flow through the graft (as shown with angiography and flow measurements), within the experimental time of 4 hours, while did they occlude within minutes when no mediation was used. Therefore, this medication will also be administered to the animals within this study, starting 4 days prior to surgery to reach optimal dose levels at the time of surgery. Medication is needed until a non-thrombogenic layer has been formed on the lumen of the grafts, which prevent the formation of thrombus, and therefore clotting. These medications are commonly used in the clinic by patients with cardiovascular diseases (so called dual therapy), and are also commonly used in other preclinical studies on CABG prior surgery and during follow-up (Ben-Gal *Journal of Cardiothoracic Surgery*2013**8**:122). Therefore, also during follow-up, we will administer these anti-coagulation and anti-thrombus medication.

Study 1 involves a bypass, using the native LIMA and connect this to the proximal part of the synthetic bioabsorbable vascular graft. The distal anastomosis will be made on the LAD. In study 2, only a synthetic absorbable vascular graft will be used as full bypass, with the anastomosis created on the ascending aorta and anastomosed to the left circumflex artery. The study will be performed by using a cardiopulmonary bypass (CPB, also known as a heart-lung machine).

After implantation of the vascular grafts, an echography and angiography will be performed to assess whether the graft is functional and good flow is observed through the anastomoses and the graft. During follow-up, non-invasive echography will be performed at several time points. In addition, angiography and blood sampling will be performed on the animals during follow-up, as indicated in table 1. Blood sampling takes 5 minutes and can be performed in the stable, echography will take 15 minutes, while the whole angiography procedure might take up to 45-60 minutes. However, angiography is under general anaesthesia. Furthermore, a weekly health check will be performed where behaviour, weight, temperature, and general health condition will be monitored.

After killing of the animals, the grafts will be removed en bloc with the surrounding native tissue. This will be rinsed free of blood with saline. Macroscopic analysis will be performed (tissue formation, calcification, thrombosis), followed by fixation of the samples in formalin. Microscopic analysis include but are not limited to H&E, Movat Pentachrome, Von Kossa, and Von Willebrand factor stainings. See table 1 for an overview of the complete overview of all analysis.

Table 1 Analysis

Type of analysis	Time point	Results
Angiography	Several time points after surgery with a maximum of n=7	Patency graft, flow patterns within graft, diameter graft and anastomotic orifice
Transthoracic echo	Several time points after surgery with a maximum of n=13	Function of the heart
Direct echo on graft	After implantation and before killing	Blood flow through graft, quality of anastomosis
Health monitoring	Weekly	General health of the animals including weight, activity, appetite, signs of illness/infection/pain
Blood sampling	Several time points with a maximum of n=15, and in case of a complication	Biochemistry parameters and Cells blood count
Coagulation	Several time points after surgery with a maximum of n=10	Coagulation factors
Macroscopic assessment	After killing	Tissue formation, thrombosis, calcification, morphological changes, injury
Microscopic assessment	After killing	Tissue formation, absorption material, calcification

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment.

Provide justifications for the selected approach.

In study 1, all study animals will be anesthetized and intubated. Following induction of anaesthesia and instrumentation, the sheep will be surgically scrubbed and draped. A sternotomy will be performed, follow by harvesting of the LIMA from the left inner part of the sterna bone. Subsequently, cannulas will be placed to allow CPB to be performed. When the animal is on-pump, the LAD will be dissected. The proximal anastomosis of the implanted graft segment will be made on the distal LIMA, and the distal anastomosis on the LAD (see Figure 1). The native LAD will be ligated to allow only blood flow through the implanted vessel. After implantation, the animal will be weaned from CPB, and the cannulas will be removed. Thereafter, a sterile echo probe can be placed on the implanted graft to assess the flow through the graft, and to visualize the anatomy of the created anastomosis. In addition, an angiography will be made and the animal will be closed. After detubation and removal of the chest drains, the awaken animal is transported to the stables for further recovery.

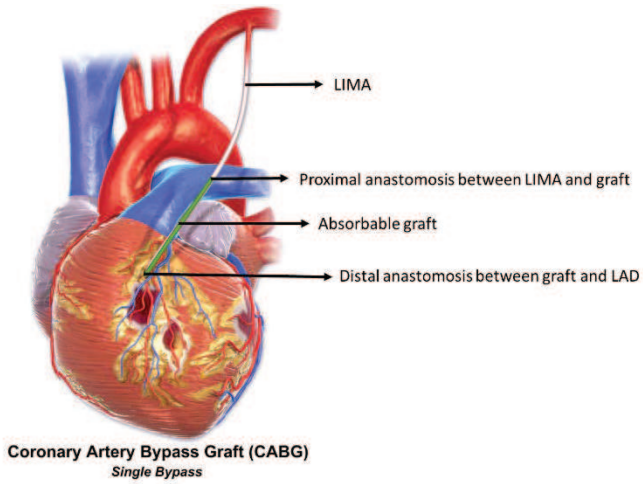


Figure 1 Bypass surgery using a short, straight absorbable graft (in green). The native LIMA is used in addition to create a bypass. The graft is positioned between the LIMA and the LAD.

In study 2, all study animals will be anesthetized and intubated. Following induction of anaesthesia and instrumentation, the sheep will be surgically scrubbed and draped. A left thoracotomy in the fourth intercostal space will be performed, follow by a placement of the cannulas to allow onset CPB. When the animal is on-pump, dissection of the aorta and the circumflex artery will be performed. The proximal anastomosis of the implanted synthetic graft will be made on the ascending aorta, and the distal anastomosis on the left circumflex artery (see Figure 2). The native left circumflex artery will be ligated to allow only blood flow through the implanted vessel. After implantation, the animal will be weaned from CPB, and the cannulas will be removed. Thereafter, a sterile echo probe can be placed on the implanted graft to assess the flow through the graft, and to visualize the anatomy of the created anastomosis. In addition, an angiography will be made and the animal will be closed. After detubation and removal of the chest drains, the awaken animal is transported to the stables for further recovery.

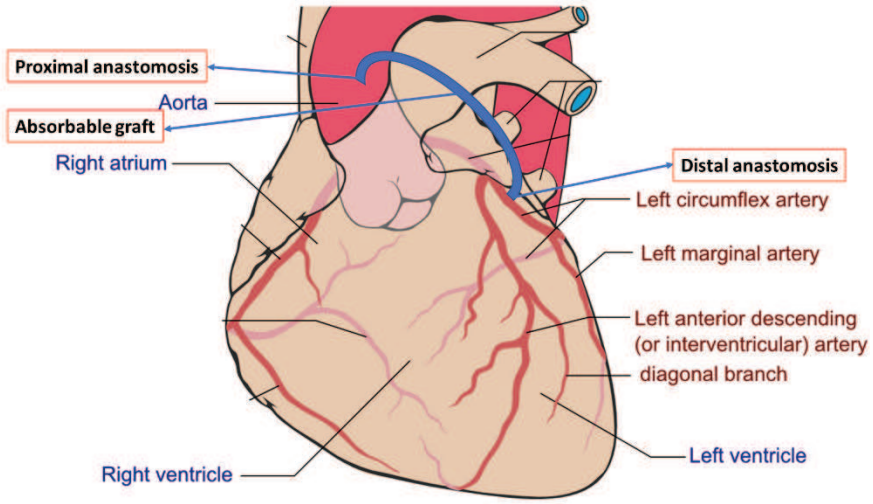


Figure 2 Bypass surgery using a long, bendable graft (in blue), which is located between the aorta and the left circumflex artery. No native vessels are needed to create a full bypass.

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

Motivation of animals included in the study:

Comparable studies in literature have shown to use a similar number of animals per group (n=7 used in Ben-Gal *Journal of Cardiothoracic Surgery*2013**8**:122, and n=5 used in Hasegawa ASAIO J. 2005 Nov-Dec;51(6):725-9). The minimum number of animals should be used consistent with obtaining meaningful results (see ISO 10993-2). The results of this observational study will be compared to results that are widely available in literature and in compliance with the guidelines of the US Food and drug Administration.

A power calculation with the following parameters was performed:

- Type 1 error of 5%
- Power of 80%
- Using a qualitative scale (completely occluded or not)
- An average of 70% (40-100%) of the synthetic grafts occlude within 12 months according literature (Pashneh Tala 2016 TE vascular grafts past present and future, ASAIO Journal 2005; 51:725–729.)
- Although all of the vascular grafts in the carotid position were patent after 12 months, we assume that 25% of the absorbable grafts will occlude within 12 months when implanted as a CABG, as smaller diameters and longer grafts are used.

Performing the calculation with these parameters results in a minimal amount of 8 animals per group. 20% extra animals will be included, as this is the expected percentage that will reach a human endpoint. Therefore, the total number of animals included per group will be 10. In each study, n=10 animals at each time point (3, 6, and 12 months) will be killed. This will be n=30 animals for study 1 and n=30 animals for study 2, which is n=60 animals in total.

B. The animals

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

Sheep, Swifter, n=60, adult, both female and male (1 to 2 year-old at start of study). Adult animals will be used as these animals hardly grow during the study. Sheep closely mimic human anatomy and physiology allowing the implantation of clinical sized grafts using standard surgical procedures. In addition, sheep are

widely available and relatively easy to handle.

A known and approved breeder, will be used to obtain sheep for preclinical studies.

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.

For this study, animals are needed as the in-vivo functionality, tissue formation, and degradation can only be assessed in a living animal and are not otherwise available. The to be implanted biodegradable synthetic vascular grafts were extensively tested (degradation speed, interaction between material and blood) using in-vitro systems. Furthermore, cadaver studies and acute in-vivo studies in sheep were performed to test the optimal size, routing and suturability of the grafts. This allowed us to optimize the vascular grafts before these chronic animal studies will be performed. The ovine model is chosen as this model is commonly used to show functionality and safety of cardiovascular products. The anatomy and physiology mimics that of human.

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

The surgery will take place in a sterile surrounding under general anesthesia Detubation and removal of chest drains is performed on the surgery room. The animal's recovery will take place in the stables in a separated box with regular surveillance of certified personnel. Animals will receive pain killers, antibiotics, and anti-arrhythmia during standard post-op care. Pain will be minimized by the administration of pain killers during the first days after surgery. Fear due to solitaire housing might occur during the first days, however, after the intensive care period, the animals will be housed in groups again as soon as possible. Daily observations will be made during the intensive care period, including wound care, general inspection of vital functions, heart frequency, breath frequency, and general condition. Clinical health will be monitored on a weekly basis after the intensive care period.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

Painkillers will be administered

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Post-operative complications (cardiopulmonal, (myocardial infarction), pain, and hematoma), infection, fever

Explain why these effects may emerge.

- Post-operative bleeding (surgical, coagulation disorder), arrhythmia (owing to pericardiotomy, graft dysfunction, graft occlusion), decreased functionality of the lungs 2-3 days post op (post cardiotomy lung dysfunction, dyspnea), graft dysfunction or graft occlusion (myocardial infarction,

cardiac arrest)

- Pain can result in decreased appetite
- Infection of the wound might result in fever and general illness
- Weekly during the first month, and monthly after that non-invasive echography will be performed (minimal discomfort)

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

Administration of painkillers, diuretics during the first days, antibiotics, anticoagulation (pre op and post op). All treatments will be taken after consultation of the Veterinary staff.

Post op care, solitaire housing during the first post-op time, post op (intensive care) monitoring

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.

- Animal does not stand up
- Severe cardiopulmonal symptoms (continue tachydardia >150), tachypneu, weak arterial pulsations (auscultation, evidence of lung edema), evidence of uncontrollable blood loss
- Infection → fever, no response on antibiotics other than standard post op antibiotics
- Animal does not eat → loose of weight
- Diagnostics → echocardiographic evicence of heart failure, cardiac tamponade,
- Animal suffering due to severe complications due to, or not due to the implanted device.

Indicate the likely incidence.

Mild to moderate. We expect the risk of reaching human end points to be 20%.

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’).

Severe

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The animals will be killed at the end of the study, as it is needed to explant the graft material. This will allow to perform macroscopic and microscopic analysis of the implanted material, resulting in data on tissue formation and material degradation, which cannot be analysed in-vivo.

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

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

☒ Yes

DEC UTRECHT

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.500.007
2. Titel van het project : Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model
3. Titel van de NTS : Evaluatie van een omleidingsvat gemaakt van een bioafbreekbaar materiaal voor bypass operaties

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

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC	: DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon	: [redacted]
Emailadres contactpersoon	[redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 04-05-2017
   - ☐ aanvraag compleet:
   - ☒ in vergadering besproken: 17-05-2017
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 24-05-2017/20-06-2017 en 28-06-2017/19-07-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
   - ☐ aanpassing aanvraag:
   - ☒ advies aan CCD: 20-07-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager
   - Datum: nvt
   - Plaats:
   - Aantal aanwezige DEC-leden:
   - Aanwezige (namens) aanvrager:
   - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
   - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum vragen: 24-05-2017
   - Datum antwoord: 20-06-2017
   - Gestelde vragen en antwoorden:

- Bijlage 1, B. De dieren: De DEC mist hier de berekening van het benodigde aantal groepen en het totaalaantal dieren. Deze punten komen weliswaar in de projectbeschrijving aan bod, maar dienen ook in de bijlage opgenomen te worden. Graag aanvullen.
  Dit is opgenomen in de bijlage.
- Niet Technische Samenvatting: De DEC raadt u aan de NTS fors in te korten en technische beschrijvingen ten behoeve van de leesbaarheid eruit te halen.
  Dit is gewijzigd.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Correspondentie met de aanvrager
- Datum vragen: 28-06-2017
- Datum antwoord: 19-07-2017
- Gestelde vraag en antwoord:
  - Bijlage 1: Klopt het dat dieren van beide geslachten (afhankelijk van de beschikbaarheid) in gelijke mate zullen worden ingezet? Indien alleen man/vrouw wordt gebruikt dan dient dat aangegeven en gemotiveerd te worden in de bijlage.
    Het klopt dat dieren van beide geslachten (afhankelijk van de beschikbaarheid) in gelijke mate zullen worden ingezet. Dit is aangepast in de tekst.
- Het antwoord heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het beschrijft het onderzoek naar de bio compatibiliteit van een nieuw soort implanteerbare kunstbloedvaten gemaakt van biologisch afbreek materiaal ('graft'). Er is een grote behoefte aan kunstbloedvaten welke nodig zijn bij 'bypass' operaties. Bij patiënten die lijden aan atherosclerose zijn de eigen bloedvaten, welke

normaal gesproken bij voorkeur worden gebruikt, vaak onbruikbaar omdat deze te stug zijn geworden. Nadeel van de huidige generatie kunstvaten die uit polymeren bestaan, is dat deze ook erg stug zijn en mechanische problemen opleveren om goede aansluiting te maken tussen de coronair vaten en de graft. Er is nu een nieuwe generatie grafts gemaakt van biologisch afbreekbaar materiaal. Deze grafts worden na implantatie langzaam geabsorbeerd door het lichaam en vervangen door eigen bloedvatweefsel. Daarnaast zouden patiënten die deze graft ontvangen niet langer meer afhankelijk zijn van antistolling behandeling. De experimenten beschreven in deze aanvraag moeten de vraag beantwoorden of deze generatie grafts (dik en dun) ook op langere termijn (meer dan 1 jaar) inderdaad volledig afbreekbaar zijn in-vivo en er geen sprake is van groei van ongewenst weefsel ('fibrose vorming') of calcificatie. Technisch zal worden onderzocht of de kunstvaten voldoende buigzaam zijn zonder te 'knikken' bij het implanteren in de patiënt.
De voorgestelde experimenten zijn naar de mening van de DEC logisch en helder opgeschreven en beargumenteerd, en ze zijn nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt, met duidelijke uitkomstparameters en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van oordeel dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 4B uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om te onderzoeken of deze nieuwe generatie kunstbloedvaten technisch bruikbaar zijn (voldoende buigzaam en goede aansluiting op een bestaand bloedvat) tijdens de operatie en na implantatie volledig worden afgebroken door de patiënt en vervangen door eigen bloedvatweefsel zonder dat daarbij overvloedig weefsel wordt gevormd (fibrose) of met veel kalkafzetting waardoor het vat dicht gaat zitten. Het uiteindelijke doel van het project is aantonen dat deze kunstbloedvaten technisch bruikbaar zijn tijdens de operatie en voor de patiënt meerwaarde hebben ten opzichte van de huidige kunstbloedvaten zijn. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het onderzoeksveld en de patiënten welke chirurgisch van een nieuw bloedvat moeten worden voorzien. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (stress) en de rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de patiënt worden bevorderd zijn: herstel van bloedvaten/circulatie na bijvoorbeeld een hartinfarct zonder kans op bijkomende complicaties als stenose van het kunstbloedvat. De morele waarden die

voor het onderzoeksveld worden bevorderd zijn: wetenschappelijke ontwikkelingen doordat meer inzicht wordt verkregen in het gebruik van bio compatibiliteit van een nieuw soort implanteerbare kunstbloedvaten.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. De groep geniet grote bekendheid op dit gebied en heeft ervaring met het voorgestelde model. Daarom moet het haalbaar zijn dat de resultaten van dit project op termijn leiden tot het gebruik van biologisch afbreekbare kunstvaten bij o.a. hart en vaatziekten.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Recent in vitro onderzoek en een eerste pilot in schapen heeft laten zien dat de geïmplanteerde vaten een goede doorstroom hadden voor ruim 6 maanden zonder fibrose of calcificaties. Dat is de aanleiding voor het huidige beschreven verdere onderzoek naar smallere en gebogen grafts.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
   - ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
   - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
   - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
   - ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
   - ☐ Zwerfdieren (10h)
   - ☐ Hergebruik (1e lid 2)
   - ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
   - ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
   - ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Het cumulatieve ernstige ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren worden onder anesthesie gebracht waarna een of meerdere coronaire grafts worden geplaatst. Met behulp van angiografie en echografie wordt net als bij de humane patiënt in de tijd de bloeddoorstroom gemeten. In bloedmonsters worden biochemische- en stollings- parameters bepaald. Aan het einde van het experiment wordt post-mortem de staat van de grafts histologisch verder onderzocht. Het is logisch dat verder histopathologisch onderzoek naar de grafts alleen kan worden uitgevoerd indien het dier wordt gedood.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek en mogelijk gedragsmatig aangetast (minder eetlust). Door de operatie hebben de dieren tijdelijk last van pijn door de sternotomie. Tijdelijk kan ten gevolge van de operatie de longfunctionaliteit zijn afgenomen. Indien de grafts (onverwacht) niet goed zouden functioneren zou een myocardinfarct kunnen optreden.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het betreft een zware operatie die wordt uitgevoerd in de openborst holte met reële kans op cardiopulmonale complicaties gedurende of kort na de operatie. Ook indien tijdens metingen afwijkingen worden geconstateerd zoals hartfalen is dit reden voor een humaan eindpunt. De proeven worden uitgevoerd door zeer ervaren medewerkers en er is een dierenarts in huis voor overleg en/of behandeling bij complicaties.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om de in-vivo functionaliteit voor toepassing in de mens te kunnen onderzoeken is het noodzakelijk dat afbraak van de graft en nieuwe weefselvorming in een anatomisch vergelijkbaar dier wordt vastgesteld zonder schadelijke bijwerkingen als fibrose of overmatige kalkafzetting.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Er is al veel vooronderzoek uitgevoerd met in-vitro methoden. Het betreft hier een beschrijvende studie waarvoor bruikbare data moeten worden verzameld die zullen voldoen aan de FDA richtlijnen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De operaties worden door zeer deskundige cardiovasculair chirurgen uitgevoerd en begeleidt door een dierenarts. De perioperatieve zorg is gelijk aan de zorg welke aan humane patiënten wordt gegeven. Er is gekozen voor het schaap omdat het een representatief model is voor research op cardiovasculair gebied vanwege de anatomische en fysiologische gelijkenissen met de mens.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten (afhankelijk van de beschikbaarheid) zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Histopathologisch onderzoek van de geïmplanteerde vaten is een belangrijk onderdeel om de buikbaarheid vast te stellen. Explantatie van de graft is theoretisch mogelijk, maar dan is herstel van de bloedsomloop opnieuw nodig. Dat brengt opnieuw ernstig ongerief met zich mee. Het is dus logisch dat het dier wordt gedood om de grafts uit te kunnen nemen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.

20. Hergebruik is niet overwogen omdat het voor het project relevant is histopathologisch onderzoek toe doen, zie C19, en het daarvoor nodig is de dieren te doden.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk vaststellen dat buigzame, biologisch afbreekbare kunstbloedvaten beter zijn als vervangend bloedvat bij cardiovasculaire aandoeningen dan de huidige kunstbloedvaten, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met ernstig ongerief.
   Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat patiënten met cardiovasculaire aandoeningen, welke een chirurgisch ingrijpen nodig hebben om de bloedsomloop te herstellen, beter geholpen kunnen worden. De chirurg kan het buigzame materiaal beter inhechten en de kans op aangroei van littekenweefsel (fibrose) of kalk is minder dan bij de huidige bloedvaten, omdat deze graft door het lichaam wordt vervangen door een lichaamseigen nieuw bloedvat. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de evaluatie van nieuwe bloedvaten van biologisch afbreekbaar materiaal een substantieel belang vertegenwoordigt omdat de huidige generatie kunstbloedvaten nog veel nadelen hebben en dat dit belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

   ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

   ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Centrale Commissie Dierproeven

6.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht /Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020172744

Bijlagen
2

Datum 27 juli 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 26 juli 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020172744. 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.

Datum:
27 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172744

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
27 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172744

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11500
Naam instelling of organisatie:	UMC Utrecht /Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	30244197
Postbus:	12007
Postcode en plaats:	3501 AA UTRECHT
IBAN:	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
27 juli 2017
Aanvraagnummer:
NL-150020172744

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 september 2017
Geplande einddatum:	1 september 2022
Titel project:	Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model
Titel niet-technische samenvatting:	Evaluatie van een bioafbreekbare graft voor bypass operaties
Naam DEC:	DEC Utrecht
Postadres DEC:	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Utrecht
Datum:	25 juli 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020172744

Bijlagen
2

Datum 27 juli 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 27 juli 2017
Vervaldatum: 26 augustus 2017
Factuurnummer: 172744
Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020172744	€ 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.

7.

[redacted])

Van: [redacted]
Verzonden: donderdag 14 september 2017 13:12
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: Antw.: • AVD1150020172744: aanvullende informatie •
Bijlagen: 2017·II·500·007 Appendix to proposal_CABG final 14092017.docx; Niet technische samenvatting_CABG final 14092017.docx

Categorieën: Dossier: [redacted]

Beste,

Zie hieronder de aangevraagde aanvullende informatie betreffende AVD1150020172744. In de bijlage zijn de aangepaste documenten te vinden waarin deze informatie is verwerkt.

Vraag 1
Er is sprake van de volgende categorie bijzondere handelingen: huisvesting anders dan bijlage III van de richtlijn. Dieren worden na de operatie, gedurende de intensive care periode, individueel gehuisvest. Daarna worden de dieren weer in de groep geplaatst. In de bijlage dierproeven wordt onder 'F' echter aangegeven dat de dieren volgens bijlage III gehuisvest worden. U wordt verzocht de bijlage dierproeven aan te passen en de individuele huisvesting te onderbouwen.
Antwoord op vraag 1
Uw commissie heeft terecht opgemerkt dat de dieren volgens bijlage III gehuisvest worden. Inderdaad verblijft het geopereerde dier ten miste een nacht apart gehuisvest zonder directe fysieke verstoring van de andere dieren in de stal en het dier is onder regelmatig toezicht van de dierverzorgers. Echter de huisvesting is zodanig georganiseerd dat de langer geleden geopereerde en de nog niet geopereerde dieren in dezelfde grote stal ruimte staan, echter het zojuist geopereerde dier is slechts gesepareerd d.m.v. een open hek met spijlen in de hoek van de stal. Sommige groepen staan gescheiden met een hek in dezelfde stal. Vandaar dat we naar ons inzicht de dieren huisvesten volgens bijlage III, inclusief het zojuist geopereerde dier. In de meeste gevallen staat het zojuist geopereerde dier de volgende dag op de benen, eet hooi, produceert urine en mest. Indien alle controles kloppen gaat het dier weer tussen de andere dieren vertoeven. in sommige gevallen is het nodig het dier nog even de rust te gunnen. We hebben de bijlage III aangepast met bovenstaande tekst.
Vraag 2
Op het aanvraagformulier wordt aangegeven dat de vergunning wordt aangevraagd voor 5 jaar. In de NTS staat echter dat de looptijd van de vergunning 2 jaar bedraagt. U wordt verzocht aan te geven wat correct is.
Antwoord op vraag 2
De looptijd van het project is inderdaad vijf jaar. De NTS is aangepast (2 jaar naar 5 jaar)

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groeten,
[redacted]

--
[redacted]

This message and any attachments are solely for the intended recipient and may contain confidential or privileged information. If you are not the intended recipient, any disclosure, copying, use, or distribution of the information included in this message and any attachments is prohibited. If you have received this communication in error, please notify us by reply e-mail and immediately and permanently delete this message and any attachments. Thank you.

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.

1

General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number: 1 Type of animal procedure: Bypass implantation

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.
Preceded research. In-vitro studies and acute in-vivo have been performed to assess the usage of medication to improve the patency of absorbable grafts. It has been shown that the use of anti-coagulation

and anti-thrombus medication prior to surgery improved the outcome (patency). It was shown that grafts did not occlude and showed good flow through the graft (as shown with angiography and flow measurements), within the experimental time of 4 hours, while did they occlude within minutes when no mediation was used. Therefore, this medication will also be administered to the animals within this study, starting 4 days prior to surgery to reach optimal dose levels at the time of surgery. Medication is needed until a non-thrombogenic layer has been formed on the lumen of the grafts, which prevent the formation of thrombus, and therefore clotting. These medications are commonly used in the clinic by patients with cardiovascular diseases (so called dual therapy), and are also commonly used in other preclinical studies on CABG prior surgery and during follow-up (Ben-Gal *Journal of Cardiothoracic Surgery*2013**8**:122). Therefore, also during follow-up, we will administer these anti-coagulation and anti-thrombus medication.

Study 1 involves a bypass, using the native LIMA and connect this to the proximal part of the synthetic bioabsorbable vascular graft. The distal anastomosis will be made on the LAD. In study 2, only a synthetic absorbable vascular graft will be used as full bypass, with the anastomosis created on the ascending aorta and anastomosed to the left circumflex artery. The study will be performed by using a cardiopulmonary bypass (CPB, also known as a heart-lung machine).

After implantation of the vascular grafts, an echography and angiography will be performed to assess whether the graft is functional and good flow is observed through the anastomoses and the graft. During follow-up, non-invasive echography will be performed at several time points. In addition, angiography and blood sampling will be performed on the animals during follow-up, as indicated in table 1. Blood sampling takes 5 minutes and can be performed in the stable, echography will take 15 minutes, while the whole angiography procedure might take up to 45-60 minutes. However, angiography is under general anaesthesia. Furthermore, a weekly health check will be performed where behaviour, weight, temperature, and general health condition will be monitored.

After killing of the animals, the grafts will be removed en bloc with the surrounding native tissue. This will be rinsed free of blood with saline. Macroscopic analysis will be performed (tissue formation, calcification, thrombosis), followed by fixation of the samples in formalin. Microscopic analysis include but are not limited to H&E, Movat Pentachrome, Von Kossa, and Von Willebrand factor stainings. See table 1 for an overview of the complete overview of all analysis.

Table 1 Analysis

Type of analysis	Time point	Results
Angiography	Several time points after surgery with a maximum of n=7	Patency graft, flow patterns within graft, diameter graft and anastomotic orifice
Transthoracic echo	Several time points after surgery with a maximum of n=13	Function of the heart
Direct echo on graft	After implantation and before killing	Blood flow through graft, quality of anastomosis
Health monitoring	Weekly	General health of the animals including weight, activity, appetite, signs of illness/infection/pain
Blood sampling	Several time points with a maximum of n=15, and in case of a complication	Biochemistry parameters and Cells blood count
Coagulation	Several time points after surgery with a maximum of n=10	Coagulation factors
Macroscopic assessment	After killing	Tissue formation, thrombosis, calcification, morphological changes, injury
Microscopic assessment	After killing	Tissue formation, absorption material, calcification

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment.

Provide justifications for the selected approach.

In study 1, all study animals will be anesthetized and intubated. Following induction of anaesthesia and instrumentation, the sheep will be surgically scrubbed and draped. A sternotomy will be performed, follow by harvesting of the LIMA from the left inner part of the sterna bone. Subsequently, cannulas will be placed to allow CPB to be performed. When the animal is on-pump, the LAD will be dissected. The proximal anastomosis of the implanted graft segment will be made on the distal LIMA, and the distal anastomosis on the LAD (see Figure 1). The native LAD will be ligated to allow only blood flow through the implanted vessel. After implantation, the animal will be weaned from CPB, and the cannulas will be removed. Thereafter, a sterile echo probe can be placed on the implanted graft to assess the flow through the graft, and to visualize the anatomy of the created anastomosis. In addition, an angiography will be made and the animal will be closed. After detubation and removal of the chest drains, the awaken animal is transported to the stables for further recovery.

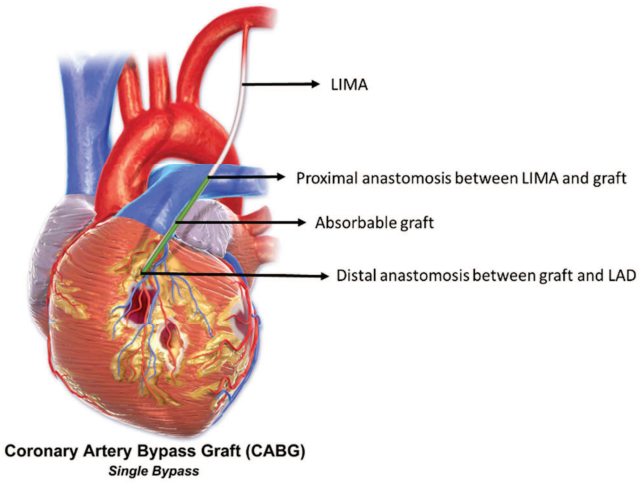


Figure 1 Bypass surgery using a short, straight absorbable graft (in green). The native LIMA is used in addition to create a bypass. The graft is positioned between the LIMA and the LAD.

In study 2, all study animals will be anesthetized and intubated. Following induction of anaesthesia and instrumentation, the sheep will be surgically scrubbed and draped. A left thoracotomy in the fourth intercostal space will be performed, follow by a placement of the cannulas to allow onset CPB. When the animal is on-pump, dissection of the aorta and the circumflex artery will be performed. The proximal anastomosis of the implanted synthetic graft will be made on the ascending aorta, and the distal anastomosis on the left circumflex artery (see Figure 2). The native left circumflex artery will be ligated to allow only blood flow through the implanted vessel. After implantation, the animal will be weaned from CPB, and the cannulas will be removed. Thereafter, a sterile echo probe can be placed on the implanted graft to assess the flow through the graft, and to visualize the anatomy of the created anastomosis. In addition, an angiography will be made and the animal will be closed. After detubation and removal of the chest drains, the awaken animal is transported to the stables for further recovery.

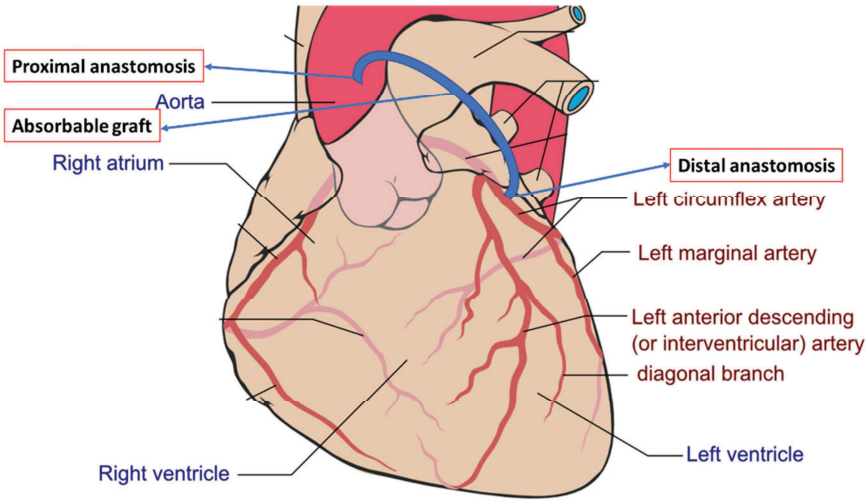


Figure 2 Bypass surgery using a long, bendable graft (in blue), which is located between the aorta and the left circumflex artery. No native vessels are needed to create a full bypass.

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

Motivation of animals included in the study:

Comparable studies in literature have shown to use a similar number of animals per group (n=7 used in Ben-Gal *Journal of Cardiothoracic Surgery*2013**8**:122, and n=5 used in Hasegawa ASAIO J. 2005 Nov-Dec;51(6):725-9). The minimum number of animals should be used consistent with obtaining meaningful results (see ISO 10993-2). The results of this observational study will be compared to results that are widely available in literature and in compliance with the guidelines of the US Food and drug Administration.

A power calculation with the following parameters was performed:

- Type 1 error of 5%
- Power of 80%
- Using a qualitative scale (completely occluded or not)
- An average of 70% (40-100%) of the synthetic grafts occlude within 12 months according literature (Pashneh Tala 2016 TE vascular grafts past present and future, ASAIO Journal 2005; 51:725–729.)
- Although all of the vascular grafts in the carotid position were patent after 12 months, we assume that 25% of the absorbable grafts will occlude within 12 months when implanted as a CABG, as smaller diameters and longer grafts are used.

Performing the calculation with these parameters results in a minimal amount of 8 animals per group. 20% extra animals will be included, as this is the expected percentage that will reach a human endpoint. Therefore, the total number of animals included per group will be 10. In each study, n=10 animals at each time point (3, 6, and 12 months) will be killed. This will be n=30 animals for study 1 and n=30 animals for study 2, which is n=60 animals in total.

B. The animals

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

Sheep, Swifter, n=60, adult, both female and male (1 to 2 year-old at start of study). Adult animals will be used as these animals hardly grow during the study. Sheep closely mimic human anatomy and physiology allowing the implantation of clinical sized grafts using standard surgical procedures. In addition, sheep are

widely available and relatively easy to handle.

A known and approved breeder, will be used to obtain sheep for preclinical studies.

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.

For this study, animals are needed as the in-vivo functionality, tissue formation, and degradation can only be assessed in a living animal and are not otherwise available. The to be implanted biodegradable synthetic vascular grafts were extensively tested (degradation speed, interaction between material and blood) using in-vitro systems. Furthermore, cadaver studies and acute in-vivo studies in sheep were performed to test the optimal size, routing and suturability of the grafts. This allowed us to optimize the vascular grafts before these chronic animal studies will be performed. The ovine model is chosen as this model is commonly used to show functionality and safety of cardiovascular products. The anatomy and physiology mimics that of human.

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

The surgery will take place in a sterile surrounding under general anesthesia Detubation and removal of chest drains is performed on the surgery room. The animal's recovery will take place in the stables in a separated box with regular surveillance of certified personnel. Animals will receive pain killers, antibiotics, and anti-arrhythmia during standard post-op care. Pain will be minimized by the administration of pain killers during the first days after surgery. Fear due to solitaire housing might occur during the first days, however, after the intensive care period, the animals will be housed in groups again as soon as possible. Daily observations will be made during the intensive care period, including wound care, general inspection of vital functions, heart frequency, breath frequency, and general condition. Clinical health will be monitored on a weekly basis after the intensive care period.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☐ No

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

The animals that underwent surgery are housed individually for 1 night, without direct physical disturbance of the other animals in the stable, and will be regularly monitored by the technicians. However, housing is arranged in such a way that animals that underwent surgery a longer time ago and the animal that underwent surgery recently, are in the same stable, just separated by an open fence with bars. Some animals are also grouped in the same stable, also separated by an open fence with bars from other animals. This is why, in our opinion, the animals are housed according Annex III, including the animal that underwent surgery most recently. In most of the cases, the animal that underwent surgery is standing the next day, and is eating and produces fertilizer. When all checks are ok, the animal is grouped again. In some cases, the animal is allowed to take some more rest before it is grouped again.

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.

Painkillers will be administered

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Post-operative complications (cardiopulmonal, (myocardial infarction), pain, and hematoma), infection, fever

Explain why these effects may emerge.

- Post-operative bleeding (surgical, coagulation disorder), arrhythmia (owing to pericardiotomy, graft dysfunction, graft occlusion), decreased functionality of the lungs 2-3 days post op (post cardiotomy lung dysfunction, dyspnea), graft dysfunction or graft occlusion (myocardial infarction, cardiac arrest)
- Pain can result in decreased appetite
- Infection of the wound might result in fever and general illness
- Weekly during the first month, and monthly after that non-invasive echography will be performed (minimal discomfort)

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

Administration of painkillers, diuretics during the first days, antibiotics, anticoagulation (pre op and post op). All treatments will be taken after consultation of the Veterinary staff.

Post op care, solitaire housing during the first post-op time, post op (intensive care) monitoring

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.

- Animal does not stand up
- Severe cardiopulmonal symptoms (continue tachydardia >150), tachypneu, weak arterial pulsations (auscultation, evidence of lung edema), evidence of uncontrollable blood loss
- Infection → fever, no response on antibiotics other than standard post op antibiotics
- Animal does not eat → loose of weight
- Diagnostics → echocardiographic evicence of heart failure, cardiac tamponade,
- Animal suffering due to severe complications due to, or not due to the implanted device.

Indicate the likely incidence.

Mild to moderate. We expect the risk of reaching human end points to be 20%.

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’).

Severe

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The animals will be killed at the end of the study, as it is needed to explant the graft material. This will allow to perform macroscopic and microscopic analysis of the implanted material, resulting in data on tissue formation and material degradation, which cannot be analysed in-vivo.

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

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

☒ Yes

Centrale Commissie Dierproeven

9.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht /Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1150020172744
Bijlagen
1

Datum 19 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 26 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model" met aanvraagnummer AVD1150020172744. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij een u een vraag gesteld over de huisvesting en verzorging van de dieren en de looptijd van de aanvraag. Met uw antwoord heeft u een aangepaste bijlage beschrijving dierproeven en een aangepaste NTS meegestuurd. 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 "Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 september 2017 tot en met 1 september 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

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

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 20 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]

ir. G. de Feuter
Algemeen Secretaris

Datum:
19 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020172744

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:	UMC Utrecht /Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Adres:	Postbus 12007
Postcode en plaats:	3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer:	11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 september 2017 tot en met 1 september 2022, voor het project "Evaluation of an absorbable bypass graft in a chronic ovine model" met aanvraagnummer AVD1150020172744, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 26 juli 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 juli 2017, ontvangen op 26 juli 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 september 2017

Naam proef	**Diersoort/ Stam**	**Aantal dieren**	**Ernst**	**Opmerkingen**
3.4.4.1. Bypass implantation				
	Schapen (Ovis aries) /	60	100% Ernstig	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen
In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.Deze beoordeling zal uiterlijk september 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Aanvraagnummer:
AVD1150020172744

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD1150020172744

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef
Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.
Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.
In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.
De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf
Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

2804

Centrale Commissie Dierproeven

1.

04 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* 11400

☐ 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.

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

Naam instelling of organisatie	[redacted]
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
KvK-nummer	
Straat en huisnummer	
Postbus	
Postcode en plaats	
IBAN	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	
(Titel) Naam en voorletters	
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
E-mailadres	
(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 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 januari 2018
		Einddatum	1 januari 2023
3.2	Wat is de titel van het project?	[redacted] pathogenese en potentiële interventie therapieën.	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	[redacted] pathogenese en potentiële interventie therapieën	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC [redacted]
		Postadres	[redacted]
		E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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*

* Wanneer de factuur direct naar de financiële afdeling van de [redacted] dient te gaan moet hier een inkoopordernummer en factuuradres worden toegevoegd door de onderzoekers, graag van te voren afstemmen met de financiële afdeling.

Inkooporder[redacted]
Factuuradres: [redacted]

Graag verzoek[redacted] factuur toe te voegen en de factuur te versturen naar het factuuradres.

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	13 f functionaris (Proefdierdeskundige)
Plaats	Amsterdam
Datum	31 - 07 - 2017
Handtekening	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11400
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul de titel van het project in.	[redacted]: pathogenese en potentiële interventie therapieën

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.

1. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
2. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
3. Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Deze projectaanvraag beschrijft het onderzoek naar "[redacted]" genoemd) **van kinderen**. Leukodystrofieën veroorzaken een gestoorde myeline depositie, myelineverlies of een algemene afbraak van de witte stof. Deze aanvraag betreft een specifieke leukodystrofie, [redacted] is één van de vaakst voorkomende leukodystrofieën bij kinderen en één van de ergste. Bij [redacted] wordt al op zeer jonge leeftijd de witte stof in de hersenen aangetast met neurologische achteruitgang tot gevolg. Patiënten overlijden vaak snel door verlies van functies. Het is een stress-gevoelige ziekte, waarbij fysieke stressoren, vooral koortsende ziekten, leiden tot snelle achteruitgang. In 2001 is vastgesteld dat [redacted] door mutaties van de genen [redacted] wordt veroorzaakt[1]. Deze genen coderen voor de 5[redacted]. Dit zijn de enige betrokken genen.

[redacted]

[redacted] spelen een essentiële rol in de homeostase van de hersenen. [redacted] De interactie tussen [redacted] en [redacted] is belangrijk voor de functie van het [redacted] in de hersenen en voor de integriteit van de [redacted] reageren op [redacted] door middel van een complex proces, zogenaamde [redacted]", wat een algemene, [redacted] met gunstige en ongunstige aspecten. [redacted] reacties variëren van veranderingen in [redacted]

[redacted] **pathologie** varieert in ernst onder patiënten: van babyleeftijd met overlijden binnen een paar maanden tot kinderleeftijd met overlijden binnen enkele jaren tot in zeldzame gevallen volwassenleeftijd met langer overleven. [redacted] pathologie varieert ook in ernst per regio van de hersenen. Niet alleen is er regionale heterogeniteit [redacted], maar ook in kans op herstel. [redacted] is veel ernstiger aangedaan dan [redacted]. In beide gebieden is de schade irreversibel en treedt nooit herstel op. Alleen [redacted] kan stress (vooral koorts) een [redacted] induceren en [redacted] kan remyelinisatie (herstel) plaatsvinden. We hebben vastgesteld dat [redacted]. De grijze stof, waaronder de cortex, is niet aangetast en astrocyten zien er normaal uit. De variatie in ernst van de ziekte en de regionale variatie in ernst van de pathologie maakt het mogelijk [redacted] te correleren met de ernst van de lokale ziekte.
Als we begrijpen waarom [redacted] *het zoveel beter doen, kunnen we dit misschien in therapie vertalen.*
We hebben aanwijzingen op een stoornis in de [redacted]
Dat de [redacted] *bijdraagt aan de* [redacted] *pathologie in* [redacted] *is zeker; hoe moet nog worden onderzocht.*

Voor verder onderzoek hebben wij **2 muismodellen** ontwikkeld met dezelfde mutaties als in de mens voorkomen. Deze muizen vertonen dezelfde klinische kenmerken en wittestofafwijkingen als patiënten en kunnen daarom gebruikt worden voor verder onderzoek[3]. Met deze muizen zijn recent

sterke aanwijzingen gevonden dat bij [redacted] inderdaad primair de astrocyten en secundair de oligodendrocyten zijn aangetast[3].

Onderzoek naar het **moleculaire mechanisme** van [redacted] heeft aangetoond dat door de mutaties de activiteit van [redacted] verlaagd is. [redacted] is essentieel voor de vertaling van mRNA naar eiwit en voor de regulatie van de snelheid van mRNA vertaling en daarmee de eiwitsynthesesnelheid. Met name is [redacted] belangrijk voor het [redacted] van de eiwitsynthese bij stress, zoals koorts. Deze reactie heet de [redacted]). De verlaagde activiteit van [redacted] leidt tot een chronische abnormale activatie van de [redacted] met verhoogd expressie van verschillende [redacted] Als gevolg hiervan treedt een verandering van het [redacted] profiel op.

Wij hebben onderzocht wat het afwijkende [redacted] profiel is in de hersenen van [redacted] patiënten en muizen (ongepubliceerde data). [redacted] van [redacted] muizenhersenen heeft [redacted] geïdentificeerd, die verhoogd of verlaagd tot expressie komen in [redacted] vergeleken met wildtype controle muizen. De screen is bevestigd op [redacted] en [redacted] met behulp van [redacted] [redacted] en [redacted]. We vinden dat alleen astrocyten en oligodendrocyten een afwijkende [redacted] vertonen. Immunohistochemische analyses op postmortem hersenmateriaal hebben aangetoond dat astrocyten en oligodendrocyten bij patiënten dezelfde afwijkende eiwitexpressie vertonen als de [redacted] muizen. We hebben gevonden dat de eerder gevonden afwijkende expressie van [redacted] gereguleerd wordt door [redacted]-[redacted] als [redacted] en mogelijk ook [redacted] en [redacted]

Hoe de regulatie precies verloopt, is nog onvoldoende bekend. Wij hebben in hersenen van [redacted] patiënten en [redacted] muizen bevestigd dat de [redacted] gereguleerde pathways, zoals [redacted] geactiveerd zijn in astrocyten en oligodendrocyten. Een link tussen [redacted] mutaties en gestoorde [redacted] van astrocyten en oligodendrocyten in [redacted] is nog onvoldoende onderzocht. *Onduidelijk is of de* [redacted] *een (onvoldoende) beschermende of causale rol in het VWM ziektemechanisme heeft.* Door de [redacted] activiteit of de daardoor gereguleerde pathways (ook aangeduid als routes) te moduleren kunnen we deze vraag beantwoorden. Deze modulaties kunnen farmacologisch of genetisch bewerkstelligd worden in de [redacted] muismodellen. Om exact te begrijpen hoe de [redacted] activiteit het best kan worden gemoduleerd om de ziekte [redacted] te beïnvloeden, wordt het onderzoek op verschillende niveaus uitgevoerd en worden resultaten onderling vergeleken. De resultaten zullen leiden tot inzicht in hoe remming of verbetering van de ziekte bij [redacted] patiënten kan worden bereikt.

Er is geen **behandeling** voor [redacted] en het ziektemechanisme is onvoldoende duidelijk om verder te komen. Wel is duidelijk dat astrocyten bij [redacted] een grote rol spelen en dat [redacted] functies aangedaan zijn. Daarom focussen we de laatste jaren op ontrafelen van de bijdrage van [redacted] aan ontstaan en progressie van de ziekte *in alle opzichten*. Voor herstel van de witte stof is het noodzakelijk dat [redacted] hersteld worden. Het aanpakken van verschillende [redacted] dysfuncties vereisen verschillende therapieën en *een succesvolle therapie zal derhalve* ***multimodaal*** *zijn,* net als bij andere leukodystrofieën[6]. Vanwege de ernst van de ziekte en het overwegend voorkomen op de jonge kinderleeftijd en ontbreken van overlevingskansen is het cruciaal om onderzoek naar multimodale therapie nu uit te voeren. Onderzoek aan het ziektemechanisme en potentiële behandelstrategieën voor [redacted] vormen het doel van het beschreven werk, in vervolg op bovenbeschreven eerder gevonden resultaten. Dit onderzoek is uitgesplitst in verschillende deelonderzoeken, die elk met elkaar samenhangen en waar resultaten voortdurend worden vergeleken met resultaten uit patiëntmateriaal. Op basis van die gegevens wordt het plan bijgesteld. Dit wordt duidelijk gemaakt in de flowchart, besproken bij 3.4.3.

Het gehele onderzoek wordt vanuit de volgende 4 disciplines uitgevoerd in muismodellen: (1) in vivo, (2) ex vivo moleculair biologisch, (3) biochemisch, en (4) histopathologisch zonder en met interventies. Op deze manier kunnen snel gegevens binnen een multidisciplinair team worden verkregen en vergeleken met het huidige of nieuw patiëntmateriaal. De interventies bestaan uit het toedienen van [redacted] en [redacted] Deze interventies worden hierna verder

uitgelegd. Voor deze multidisciplinaire aanpak is een grote subsidie aangevraagd, waarin al deze aspecten zijn benoemd. Einddoel is het ontwikkelen van multimodale therapie voor [redacted] gebaseerd op de verworven kennis.

[redacted]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het hoofddoel is te komen tot een <u>multimodale therapie</u> voor patiënten met [redacted]
Daarvoor gaan we ons de komende jaren richten op onderzoek van de pathologie, inclusief de impact van specifieke interventies, en de achterliggende mechanismen van de astrocytaire dysfunctie. Hiervoor zullen we materiaal gebruiken zowel geïsoleerd uit hersenen van overleden patiënten als uit muismodellen (normaal en [redacted] waarin de ziekte is gemoduleerd. Het doel is alle mogelijke aangrijpingspunten voor therapie van [redacted] te exploreren en op grond van de resultaten te komen tot [redacted] therapie voor patiënten.
Deze projectaanvraag is onderverdeeld in vier sub-vragen, die onderling verband houden met elkaar en bij 3.4 verder worden uitgelegd en onderbouwd.

Bijlage 1: Behandeling van [redacted] **in muizen met** [redacted] **gericht op o.a verbeterde** [redacted] **functie.**
M.a.w. vormen [redacted] het enige celtype of zijn er nog andere celtypen waarop gentherapie gericht moet worden om verbetering te bereiken?

Bijlage 2: Behandeling van [redacted] **in muizen door modulatie van** [redacted] **moleculaire routes**
M.a.w. zijn verminderde [redacted] activiteit en [redacted] activatie als enige routes verantwoordelijk voor het disfunctioneren van astrocyten en/of de pathologie van de witte stof in [redacted]

Bijlage 3: Verbetering van [redacted] **functie ex-vivo na isolatie van** [redacted] **uit muizen met** [redacted]
M.a.w. welke (slechte) functies van [redacted] moeten geremd worden en welke (goede) functies moeten worden versterkt ten gunste van [redacted]

Bijlage 4: behandeling van [redacted] **in muizen met** [redacted] **en/of** [redacted] **(van** [redacted] [redacted] **modulatie van** [redacted] **en** [redacted] **pathways, en / of** [redacted] **correctie)**
M.a.w. kan [redacted] de beschadigde witte stof bij [redacted] herstellen en is het resultaat beter met combinatie therapie die geoptimaliseerd is in bijlage 1 - 3?

Daar alle onderzoeksvragen uit bijlagen 1 – 4 grotendeels parallel zullen worden uitgevoerd, waarbij tussentijds strategische besprekingen zullen zijn om go no-go's per bijlage te bespreken (keuze vervolgstap/diermodel/interventie) is een traject van 5 jaar haalbaar om naar een eerste aanzet voor een multimodale aanpak van [redacted] te komen. Er is funding om het onderzoek te kunnen uitvoeren.
De onderzoekers hebben jarenlange ervaring op dit gebied. Er is veel samenwerking tussen de

onderzoekers en de kliniek. De technische expertise om de experimenten (zowel in vivo als ex-vivo) is al aanwezig.
Gezien het voorwerk, de preliminaire data, het aantal mensen in de onderzoeksgroep en de expertise van de onderzoeksgroep met toonaangevende publicaties is het project zeer haalbaar. Het onderzoek hangt niet van het succes van 1 specifiek experiment af.

3.3 Belang

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

[redacted] is één van de vaakst voorkomende en één van de ernstigste genetische ziekten van de [redacted]") bij kinderen. Leukodystrofieën komen bij tenminste 1:7,500 kinderen voor, waarschijnlijk vaker. [redacted] is klinisch gekarakteriseerd door progressieve motorische problemen en verlies van ook andere neurologische functies door progressief verdwijnen van de witte stof in de hersenen. De beginleeftijd en ernst van [redacted] varieert en is afhankelijke van het de precieze mutatie (genotype). De ernstigste vorm van [redacted] ontstaat al intra-uterien; de pasgeborenen hebben een ernstige encefalopathie en afwijkingen van ogen en interne organen; zij sterven binnen enkele maanden. Bij de meeste kinderen met [redacted] ontstaat de ziekte tussen 1 en 6 jaar en volgt overlijden na enkele jaren. Latere vormen van [redacted] met ontstaan na de 6 jaar zijn veel zeldzamer; dan verloopt de ziekte langzamer en leidt de ziekte tot een langzaam progressieve encefalopathie en sterven na enkele tot enkele tientallen jaren. Voor [redacted] is geen behandeling beschikbaar. Het is daarom belangrijk de pathogenese van deze ziekte beter te begrijpen om daarmee aangrijpingspunten voor interventie strategieën te vinden. Hopelijk geven de gegevens die verkregen worden uit het hier beschreven onderzoek aanwijzingen voor behandeling van deze ziekte, zodat ernstige invaliditeit en (vaak zeer) vroege mortaliteit voorkomen kan worden.

Wetenschappelijk belang

Wetenschappelijk is het belangrijk dat het ziektemechanisme wordt opgehelderd (de rol van [redacted] mechanismen en signaaltransductie bij [redacted] en gepubliceerd, zodat deze informatie voor alle relevante wetenschappers beschikbaar is. De aanpak die wij voor ogen hebben kan mogelijk ook informatie opleveren voor onderzoekers die aan andere [redacted] werken dan [redacted] Bijvoorbeeld is [redacted].

Maatschappelijk belang

Maatschappelijk is het belangrijk dat op basis van de wetenschappelijke gegevens onderzoek kan worden uitgevoerd naar de preventie en behandeling van deze ernstige ziekte, die veel leed en ook zeer hoge kosten met zich meebrengt. Daar het lijden van de patiënt ernstig en uitzichtloos is en het vaak (zeer) jonge kinderen betreft, is het leed voor de familie zeer groot. Momenteel is er geen therapie, alleen ondersteunende behandeling om het lijden te verlichten. Om een snelle voortgang van het onderzoek te garanderen is het belangrijk dat de voorbereidende stappen beschreven in de verschillende addenda apart van elkaar maar parallel kunnen worden uitgevoerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het primaire doel is een begin te maken van het ontwikkelen van [redacted] therapie voor [redacted] Hiervoor is een verdere opheldering van het ziektemechanisme onderliggend aan [redacted] en inzicht in het [redacted] falen noodzakelijk. Het onderzoek zal deels met patiëntmateriaal worden uitgevoerd en deels met materiaal uit genetisch gemodificeerde muizen, die dezelfde klinische verschijnselen en moleculaire en histopathologische afwijkingen vertonen als [redacted] patiënten, met wild-type dieren als controle.

Het onderzoek is verdeeld in de volgende research onderdelen:

1. [redacted] therapie
Gebaseerd op literatuur gegevens dat [redacted] bij andere [redacted] verbetering laten zien in de patiënt en de nieuwe [redacted] constructen veilig worden geacht voor de patiënt; op welk celtype deze therapie bij [redacted] gericht moet worden staat nog niet vast (alleen [redacted] [redacted] en [redacted] of alle [redacted] cellen?).

2. Farmacologische therapie
- zoals met [redacted] compounds, die [redacted] activiteit of [redacted] pathways beïnvloeden;
- om het [redacted] minder toxisch te maken.

3. [redacted] therapie om zieke [redacted] en [redacted] te vervangen en weefselschade te herstellen.

4. De combinatie van 1.-3. Is de basis van de [redacted] therapie:
Er zijn toenemende aanwijzingen dat [redacted] aanpak bij [redacted] beter effect heeft[6]. Sinds 2009 werken wij aan de ontwikkeling van stamceltherapie en farmacologische therapie. Daarbij kunnen nieuwe inzichten in het ziektemechanisme leiden tot nieuwe therapie strategieën.

[redacted] was tot nog toe een onbehandelbare ziekte, waar de uitkomst van vaststond: toenemende handicap en overlijden. Met meer inzicht komt therapie voor [redacted] dichter bij. Uit onderzoek aan andere [redacted] blijkt [redacted]

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

De gegevens die wij tot nu toe hebben verkregen uit zowel patiënt als muis zijn de basis voor het huidige onderzoek.
De muismodellen die wij hebben ontwikkeld geven een representatief beeld van de menselijke ziekte [redacted] De twee [redacted] modellen ([redacted]) hebben mutaties waarvan bekend is dat beide mutaties bij [redacted] patiënten onafhankelijk van elkaar een ernstig ziektebeeld veroorzaken. In de twee muismodellen zijn vergelijkbare klinische en histopathologische verschijnselen waargenomen als wij bij patiënten hebben gezien:

- [redacted]) muizen;
- en de [redacted]) muis.

Hiervan is de [redacted] het mildste model, en de [redacted] het ernstigste model.

Bijlage 1 [redacted] therapie: beschrijft de onderzoeksvraag of [redacted] een puur [redacted] ziekte is en de ziekte alleen gedreven wordt door de zieke [redacted]. Het moet duidelijk worden of er een 'by-pass' mechanisme is waardoor [redacted] niet door gezonde [redacted] gerepareerd kan worden. Dit is met name een celbiologische aanpak.

Bijlage 2 [redacted] therapie (in vivo): beschrijft de moleculaire routes van [redacted] en richt zich op de rol van [redacted] aangestuurde routes zoals de [redacted] Welke afwijkende [redacted] speelt daarbij een rol en kan het moduleren van [redacted] routes het ziekteproces beïnvloeden?
De nieuwe muismodellen (o.a. door kruisingen van de [redacted] met specifieke [redacted] muizen stammen) worden gedegen in kaart gebracht. Daarnaast zullen farmaca toegepast worden, die specifiek aangrijpen op een onderdeel van [redacted] waarna het effect in het model bestudeerd kan worden.
Hier vinden interventies ('behandelingen') plaats, en worden naast de ex-vivo analysis van moleculair –biologische en histologische parameters ook klinische relevante parameters beoordeeld op het gebied van motoriek als [redacted]

Bijlage 3 farmacologische therapie (ex vivo): beschrijft met *ex-vivo* materiaal (mens en muis) m.b.v. cel- en weefselkweek en eiwit analyses hoe de [redacted] stress geïnduceerde demyelinisatie en het noodzakelijke herstel daarvan bepalen. We willen duidelijk krijgen waarom en hoe het herstelmechanisme van de [redacted] faalt.

Bijlage 4 [redacted] therapie: beschrijft het effect met [redacted] therapie op [redacted] muizen, geïsoleerd gevolgd door verschillende combinaties met voorafgaande [redacted] therapie of [redacted] modulatie van het [redacted] routes met stoffen, die uit eerder onderzoek of uit resultaten van bijlage 1 – 3 geselecteerd zijn. Hier wordt dus de optimale [redacted] therapie gezocht.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het onderzoek naar de pathogenese en het onderzoek naar de mogelijke behandeling van patiënten met [redacted] hangen nauw met elkaar samen. De behandeling streeft er immers naar om op cel niveau het falen van de [redacted] in verschillende [redacted] te kunnen herstellen. Er is daarom bewust gekozen om enerzijds door [redacted] en [redacted] onderzoek de betrokken [redacted] te onderzoeken en door [redacted] onderzoek het [redacted] mechanisme te doorgronden en anderzijds daar waar meer inzicht verkregen wordt in een [redacted] of [redacted] mechanisme dat te repareren door [redacted]
Deze benadering is bewust verdeeld in de expertises van betrokken onderzoekers ([redacted] / [redacted]). Het gehele onderzoek valt onder de supervisie van de hoogleraar die als [redacted] ook het patiënten onderzoek leidt. In deze multidisciplinaire groep van onderzoekers worden de resultaten gezamenlijk besproken en worden vervolgstappen in het onderzoek vastgesteld. Per bijlage worden deze specifieke mijlpalen en keuzemomenten besproken, zodat per bijlage 1 – 3 alleen de optimale interventie uiteindelijk in combinatie met [redacted] in bijlage 4 zal worden onderzocht. .

Het onderzoek wordt breed opgezet door [redacted] (in muizen modellen) onderzoek te verrichten en de gegevens continue met elkaar te vergelijken. Indien in een van de onderzoekslijnen (lees dierproef beschreven in de bijlagen) resultaat gevonden wordt, wordt dit direct besproken met alle onderzoekers en wordt indien nodig het onderzoek aangepast. Daar waar gegevens leiden tot een 'dood spoor', wordt het gerelateerde onderzoek in de andere onderzoekslijn stopgezet.
Eén en ander moet duidelijk worden uit de flowchart bij 3.4.3. met de 'go-no go momenten' erin opgenomen welke per bijlage staan vermeld.

[redacted]

Figuur 1: Flowchart voor combinatietherapie via afzonderlijke benaderingen.
De flowchart brengt de strategie in beeld om met gegevens vanuit de patiëntjes, welke input geven om de ziekte eerst via aparte benaderingen ([redacted]) specifiek te onderzoeken. De onderzoeksstrategieën in bijlages 1,2,3 en 4 zullen simultaan starten. Binnen iedere bijlage zijn er GO en NO-GO stappen. Daarnaast zullen onderzoeksresultaten binnen iedere bijlage geprojecteerd worden op de andere bijlages (blauwe pijlen). Alle verkregen resultaten zullen [redacted] in bijlage 4. Alleen die benaderingen welke verbetering geven, zullen doorgaan voor het onderzoek met [redacted] therapie. Hiermee willen vinden welke aangrijpingspunten helpen om de ziekte [redacted] te verbeteren. Met een combinatie therapie moeten de afzonderlijke benaderingen elkaar versterken en hopen we uiteindelijk de ziekte tot stilstand te kunnen brengen of te genezen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] **therapie** gericht op o.a verbeterde [redacted] functie.
2	Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] **moleculaire interventie**
3	Verbetering van [redacted] functie door [redacted] **interventie**: ex-vivo analyses na isolatie van o.a [redacted] uit muizen met [redacted]
4	Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] van [redacted] en [redacted], en / of [redacted]
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	[redacted] in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën
1.2	Looptijd van het project	5 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Kinderen, erfelijke dodelijke hersenziekte, [redacted]

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 maatschappelijk belang)	Neurodegeneratieve ziekten zijn aandoeningen waarbij hersenen en of zenuwstelsel zijn aangedaan. Een van de ernstigste ziekten op dit gebied bij kinderen is de erfelijke wittestofziekte waarbij de witte stof uit de hersenen verdwijnt. Deze ziekte wordt om die reden "[redacted]) genoemd, "verdwijnende witte stof" en valt onder de zogenaamde "[redacted] (de genetische hersen-wittestofziekten). Hierdoor ontwikkelen deze kinderen o.a motorische coördinatieproblemen, spasticiteit en epilepsie. Veel van deze kinderen sterven al heel jong, maar ook de milde vorm van deze ziekte veroorzaakt een relatief vroege dood. Als in gezonde kinderen en volwassenen de witte stof van de hersenen beschadigd wordt, [redacted] Wij hebben eerder gevonden dat dit herstelmechanisme bij kinderen met VWM faalt. Uit de kliniek weten we dat koorts de ziekte snel kan verergeren. Met

dit onderzoek willen we met verschillende onderzoeksmethoden uitzoeken hoe [redacted] werkt, waarom [redacted] de ziekte zo snel verergert en hoe de [redacted] hersteld kan worden. De resultaten samen moeten leiden tot een behandelwijze waarbij de ziekte tot staan kan worden gebracht of misschien zelfs wel genezen kan worden.
Om goed te onderzoeken welke cellen, enzymen en eiwitten betrokken zijn, wordt eerst onderzoek uitgevoerd op hersenen van overleden patiëntjes. Dat gebeurt door hersencellen ([redacted] op een speciale manier in het laboratorium te kweken en onder de microscoop te bekijken. Ook kunnen met speciale technieken betrokken enzymen, eiwitten of anders stofjes geïsoleerd worden. De gegevens worden vergeleken met gegevens die uit gezonde hersenen verkregen worden. Aan de hand van deze vergelijking wordt duidelijk welke cel of eiwit behandeld moet worden om de [redacted] te beïnvloeden. Dat is het hoofddoel van deze aanvraag en wordt in het proefdiermodel uitgezocht, dat de ziekte van de patiënt goed nabootst omdat het dezelfde genetische afwijking heeft. De bedoeling is de invloed van een [redacted] op de ziekte op hersenniveau te onderzoeken. Ook kunnen we in dieren de effecten van behandeling op het loopgedrag bestuderen. [redacted] is een zeer complexe ziekte. Wij denken dat behandeling op [redacted]. Dat wordt [redacted] genoemd.

3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Uiteindelijk moet het onderzoek leiden tot een [redacted] voor patiënten met [redacted] Met [redacted] therapie wordt een [redacted] behandeling met verschillende onderdelen bedoeld. Wereldwijd lijden 1 op de 7500 kinderen aan een vorm van [redacted] Het onderzoek zal veel wetenschappelijke informatie opleveren om te begrijpen hoe [redacted] precies ontstaan en hoe deze behandeld kunnen worden. Indien dit lukt, kunnen kinderen behandeld worden en zal de ziekte tot stilstand worden gebracht of kan zelfs herstel bereikt worden. Hiermee wordt vroegtijdige kindersterfte voorkomen en heel veel leed in de familie.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	[redacted]
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren die model staan voor de ziekte zullen net als de kinderen motorische coördinatieproblemen gaan vertonen, en als er niet tijdig wordt ingegrepen ook verlamd raken. De dieren zullen echter voor dat dit gebeurt gedood worden.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	De dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. Daar waar een [redacted], zal het ongerief licht zijn. Een deel van het onderzoek kan worden gedaan met [redacted] uit de muizen. Van alle dieren zal ongeveer 40% licht ongerief en 60% matig ongerief ondervinden.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren zullen worden gedood om de hersenen te kunnen onderzoeken en waarbij wordt gekeken of er [redacted].

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.	Er worden wel proefdiervrije methoden gebruikt in het vooronderzoek. Om echter de afwijkingen en de behandeling van deze afwijkingen goed te kunnen onderzoeken is een intact lichaam nodig. De dieren worden gebruikt om geneesmiddel, dieet, gedrag te kunnen meten. Dit kan niet door b.v. celkweek worden vervangen! Het onderzoek mag uiteraard niet in kinderen gebeuren als nog te weinig bekend is of de behandeling zal werken en of die behandeling dan ook veilig is. Daarom worden muizen gebuikt om de patiënten na te bootsen. De muis staat dus model voor de patiënt.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Er wordt zoveel mogelijk gebruikt gemaakt van materiaal van overleden patiënten. Voor het onderzoek in de muis, wordt per experiment een onderzoeksplan opgesteld met daarin het minimale aantal dieren waarmee het onderzoek kan worden uitgevoerd. Soms is het nodig eerst een klein voorexperiment uit te voeren (een 'pilot') om de haalbaarheid of het beste model te toetsen. Er is een beslisboom gemaakt, met verschillende uitkomsten per experiment. Aan de hand van die uitkomst wordt het vervolgexperiment ontworpen. Het aantal dieren in deze projectaanvraag beschrijft het maximale aantal dieren, waarschijnlijk zullen veel minder dieren gebruikt gaan worden.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De muis is het kleinste model waarin de ziekte kan worden nagebootst met dezelfde mutatie in het gen als in de patiënt. Dit model is door ons goed in kaart gebracht. De ziektekenmerken in de muizen komen precies overeen met die van de patiëntjes, en zijn door dierverzorgers goed waarneembaar. De ingrepen worden uitgevoerd door bekwame en ervaren medewerkers. De huisvesting en de voeding van de muizen is gestandaardiseerd zodat weinig spreiding in de resultaten van het onderzoek wordt verwacht.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Het is bekend op welke leeftijd de dieren motorische problemen kunnen gaan vertonen. Ruim voor die tijd wordt het voer op de bodem van de kooi gelegd en worden lange tuiten op de drinkflessen gezet, zodat de dieren makkelijker kunnen eten en drinken. De dieren worden elke dag zorgvuldig geobserveerd en er zijn criteria vastgelegd aan de hand waarvan kan worden vastgesteld dat de spierverzwakking gaat optreden. Indien verwacht wordt dat de dieren daarbij meer dan matig ongerief zullen gaan hebben, zullen ze worden gedood zodat het maximale ongerief niet meer dan matig zal zijn.

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.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	

Volgnummer	Type dierproef
1	Behandeling van [redacted] met [redacted] **therapie** gericht op o.a verbeterde [redacted] functie.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De huidige gegevens wijzen erop dat [redacted] een [redacted] is. Een alternatieve hypothese is dat [redacted] wordt veroorzaakt door een simultaan effect door een mutatie van [redacted] op verschillende [redacted] celtypes. Deze vraag of [redacted] ziekte is kan worden beantwoord door onderzoek (*ex-vivo)* op de [redacted] van verschillende mutante muizen stammen.

1. **Door kruising van conditionele [redacted] knock-in muizen aan celspecifieke cre lijnen, wordt onderzocht of selectieve expressie van mutant [redacted] voldoende is om [redacted] ziekte te veroorzaken**
   Een nieuwe Cre-loxP conditionele [redacted] knock-in muizenstam, waarbij de mutatie door kruising selectief in verschillende celtypes tot expressie gebracht kan worden, wordt momenteel met CRISPR-Cas9 techniek elders gemaakt. De specifieke rol van [redacted] zal onderzocht worden door de conditionele *Eif2b5* knock-in te kruisen met muizenstammen die Cre recombinase in [redacted] tot expressie brengen.
2. **Met behulp van *in vivo* lentivirale transductie, wordt onderzocht of genetische correctie in een specifieke [redacted] celpopulatie de ziekte voorkomen kan worden.**
   Gebruikmakend van de beschikbare [redacted] [redacted] modellen (als eerste keus het [redacted] mutante model [verder te nomen [redacted]] met mild ongerief) zullen wij het genetische defect selectief corrigeren door [redacted] Deze benadering is gebaseerd op het feit dat in recessieve ziekten zoals [redacted] de introductie van één normale kopie van het gemuteerde gen al voldoende is de ziekte te genezen omdat heterozygote carriers geen ziektebeeld hebben. Om de resultaten van deze gen-correctie te bestuderen zullen we lentivirussen gebruiken die het wild type (WT) [redacted] gen tot expressie brengen van een promoter waarvan bekend is dat tot expressie komt in [redacted] celtypes. We verwachten dat correctie

in [redacted] het beste herstel geeft. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat ook andere kruisingen ([redacted] mutatie in specifieke celpopulatie) een phenotype geven, wordt er gekozen voor gencorrectie in [redacted] cellen.
De constructen zullen een [redacted]) hebben met een poly-cistronic vector ontwerp gebaseerd op de [redacted] (b.v [redacted]). Dit zal het monitoren van de transductie efficiëntie en de *in-vivo* aanwezigheid en expressie faciliteren. [redacted] vectoren met alleen het [redacted] zullen als controle worden gebruikt. Deze [redacted] correctie zal direct na de geboorte en lang voor de start van de pathologie worden uitgevoerd in [redacted] muizen.

In alle muizen zal het volgende worden onderzocht:

a. klinisch fenotype ([redacted]);
b. ex-vivo h[redacted] pathologie (histologie coupes), inclusief electronen microscopie;
c. ex-vivo [redacted] maturatie, bepaling [redacted]; dit onderzoek zal op verschillende leeftijden worden uitgevoerd met immuunhistochemie en RT_PCR voor [redacted] markers.

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.

A. [redacted] injectie met [redacted] op dag 0: pups worden na spontane partus van het moederdier gebruikt.

Er is gekozen voor [redacted] injectie op P0-1 omdat de behandeling vroeg in de ontwikkeling gedaan moet worden en op deze leeftijd de toediening snel uitgevoerd kan worden. De P0-1 pups worden verdoofd dmv hypothermia (10-20C). De dieren worden niet direct op het ijs gelegd om bevroren huid te voorkomen. De cellen worden [redacted] ingebracht. Het injectievolume bedraagt maximaal 1 µl. Na toediening worden de pups op een warmhoudmatje geplaatst en na ontwaken terug bij de moeder gelegd.

Tabel 1: overzicht handelingen

A. Soort ongerief	B. Frequentie	C. Duur v.h. ongerief
[redacted] injectie	eenmalig	10 min.
[redacted]	Max 3 maal	Max 5 min per test
[redacted]	Max 3 maal	Max 5 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 5 min per test
Euthanasie	1 maal	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4 maanden		2-6 maanden

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

Het volgende go-no-go schema wordt aangehouden:

Vraag	Stap		Aantal dieren	go / no go
1	a	In vivo analyse van [redacted] mutatie in specifieke [redacted]	max. 30	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende [redacted] maturatie in brein: go naar Stap b
	b	In vivo analyse van [redacted] mutatie in specifieke [redacted] leeftijd	max. 130	

2	a	In vivo analyse van LV gencorrectie in specifieke [redacted]	max. 144	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende [redacted]: go naar Stap b
	b	In vivo analyse LV gencorrectie in specifieke [redacted]	max. 288	

Vraag 1:

Stap a:

- [redacted] muizen worden gekruist aan 4 cre-lijnen (cre-expressie in alle cellen, [redacted] cellen), of als controle niet gekruist. Alle dieren worden in eerste instantie op 1 leeftijd geanalyseerd: [redacted]
- Analyses worden uitgevoerd op vers (snap-frozen) en gefixeerd (4% PFA intracraniale perfusies) weefsel
- Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd: [redacted]
  Aantal dieren: 5 lijnen (4 kruisingen + 1 controle) x 1 leeftijd (5 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 30 dieren
- Alleen de dieren die een fenotype vertonen worden gebruikt in verdere analyses ('go'); andere dieren worden uit de studie gehaald ('no-go').

Stap b:

- Wanneer de dieren in Stap 1 een fenotype vertonen, zullen deze kruisingen ook in Stap 2 worden geanalyseerd: meer verschillende leeftijden.
- Conditionele [redacted] mutanten worden geanalyseerd op [redacted] of eerder als er significante verbetering is gezien in de behandelde groep(en).
- De 12 maanden dieren worden op maximaal 7 maanden geanalyseerd met [redacted] (om het aantal dieren te verminderen wordt deze groep dus voor 2 parameters gebruikt). Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd: [redacted]
  Aantal dieren voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 2 (1 kruising = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 40 dieren
- Om de [redacted] maanden dieren te verzamelen. Gebaseerd op een eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd: [redacted]
  Aantal dieren voor pre-symptomatisch analyse: 2 (1 kruising + 1 controle) x 1 leeftijden ([redacted]) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 12 dieren
- Zullen er meer leeftijden van verschillende kruisingen worden geanalyseerd, hoeft er geen nieuwe controle groep worden meegenomen. [redacted]. En voor 4 kruisingen voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 5 (4 kruisingen = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 100 dieren
- Maximaal aantal muizen: 52 – 130

Vraag 2:

Stap a:

Gen correctie met virale constructen die specifieke [redacted] celtypen targeten, dmv [redacted] Als controle wordt MOK virus gebruikt. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat meer dan 1 kruising [redacted] mutatie in specifieke celpopulatie) een phenotype geeft, wordt er gekozen voor gencorrectie op maximaal 2 celtypes (= 2 genconstructen).

- Poweranalyse: Gebaseerd op eerdere studies ([redacted]
  - 20 dieren per groep. Per nest worden 5 tot 6 dieren geboren; dus 4 nestjes (20 dieren) per groep per leeftijd. Indien er meer dieren worden geboren, worden die wel gebruikt in het experiment, dus wordt verder met 24 dieren gerekend
- Maximaal aantal dieren: 3 injecties (2 genconstructen, MOK) x 1 leeftijd ([redacted]) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 120 - 144 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met MOK) wordt getest, zal dit 80 – 96 dieren zijn.

Stap b:

- Wanneer dieren op [redacted] (Stap 1) een verbeterd fenotype vertonen, zullen meerdere leeftijden worden bekeken tot maximaal het humane eindpunt.
- Aantal dieren: 3 injecties (genconstruct, MOK) x 2 leeftijden ([redacted], max humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 240 - 288 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met MOK) wordt getest, zal dit 160 – 192 dieren zijn.

B. De dieren

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

Muis, mus musculus en genetisch gemodificeerde muizen.
Cre-loxP conditionele [redacted] knock-in muizenstam
Muislijnen die Cre recombinase in [redacted] cellen tot expressie brengen

Alle dieren zijn afkomstig van erkende fokkers EU/USA of eigen fok.
Maximaal **592** dieren
.

Levenstadia: pups (beide sexen) welke spontaan worden geboren en weke op dag 0 of 1 worden behandeld.
[redacted].

-

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 is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. [redacted] Daarnaast kunnen wij niet vrijelijk therapeutica uitproberen bij levende patiënten. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden [redacted]); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

Vermindering:
Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Van het uitgenomen materiaal ([redacted] wordt alles gebruikt voor verdere ex-vivo analyse. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

Verfijning
Zodra blijkt dat na interventie significante fenotypische veranderingen worden waargenomen, zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar 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.

[redacted].

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

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.

[redacted]

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het wegnemen van de pups voor de [redacted].
Kenmerken van [redacted] ziekte in muizen: [redacted].

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

[redacted]

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

Maximaal dagelijkse observaties van [redacted].
Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
[redacted]. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.
In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

Tabel 2: ongerief per handeling

A. handeling:	**B. kwalificatie** *terminaal/gering/matig/ernstig*	**C. duur v.h. ongerief**
Uithalen baarmoeder	terminaal	
[redacted]	Matig (onder anesthesie)	10 min.
[redacted]	Gering	3x 5 min
[redacted]	Gering	4x 5 min
Doden	Licht (onder anesthesie)	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4mnd	Matig	2-6 maanden

Cumulatief ongerief: Matig voor de pups
Terminaal/Licht voor de moederdieren

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 [redacted] moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyses, een deel van de pups wordt onder anesthesie geperfundeerd [redacted] te maken voor immunohistochemie.

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.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in	[redacted]
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie	[redacted]

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

Volgnumme	Type dierproef
2	Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] routes

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Gebaseerd op uitkomsten van eerdere experimenten in onze groep zal verder onderzocht worden wat de moleculaire mechanismen zijn achter de ziekte [redacted] Hierbij hopen we de effecten van selectieve mutaties van het [redacted] op te helderen, en nieuwe aanwijzingen te vinden voor therapie in patiënten. De experimentele set-up gaat hierbij dieper in op de mechanismen en de invloed van [redacted] routes op [redacted]
De primaire uitkomst parameters zijn:

- In-vivo: [redacted]:
- Ex-vivo [redacted],
- Ex-vivo: [redacted]

Hoofdvraag: hoe leiden mutaties van het [redacted] tot het disfunctioneren van [redacted] hersen-[redacted] pathologie en klinische verschijnselen in muizen met [redacted] (hierna aangegeven als "ziekte".
Aanpak: door [redacted] routes die door [redacted] gereguleerd worden te veranderen en vervolgens de effecten op klinische ziekte verschijnselen en de hersenpathologie te onderzoeken.

We weten dat één van de door [redacted] routes, de [redacted]), zoals beschreven in de projektbeschrijving, actiever is in [redacted] van muizen en mensen met [redacted] dan in controles. Op dit moment weten we echter niet of veranderde [redacted] en [redacted] [redacted] routes als de [redacted] oorzakelijk bijdrage aan "ziekte" of dat ze juist beschermend werken maar tekort schieten met [redacted] als gevolg. Het is bekend dat enzym activiteit van [redacted] direct en indirect de expressie van een groot aantal genen reguleert. Wij weten nog niet welke

onderdelen van de door [redacted] gereguleerde routes belangrijk zijn in [redacted] en hoe (gunstig of ongunstig). Daarnaast kunnen andere routes ook aan [redacted] "ziekte" bijdragen of beschermen tegen "ziekte". **Voor het ontwikkelen van [redacted] therapie is het belangrijk om beter begrip te hebben van het mechanisme hoe mutaties van [redacted] en hoe veranderingen in door [redacted] routes bijdragen aan VWM.**
Op dit moment wordt experiment 1 in deze bijlage al uitgevoerd gebaseerd op een DEC project [redacted]
N.B. Dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 ivm de fok van voldoende dieren voor experiment. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een (tijdrovend) amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

In experiment 1 worden de [redacted] en [redacted] eerst gemoduleerd met een farmacon [redacted]).
In vervolgexperimenten willen we de bijdrage van [redacted] routes verder uitzoeken door een [redacted] interventie (door gebruik te maken van [redacted] muizenstammen, beschreven in 2A) en [redacted] modulatie (beschreven in 2B). Ook kan de bijdrage verder onderzocht worden met een aangepast [redacted] waarin [redacted] zoals bijvoorbeeld [redacted] in andere concentraties worden toegediend (beschreven in 2C). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [redacted] op de ziekte parameters.
Op basis van de uitkomst uit experiment 1 zijn de vervolgexperimenten beschreven in 2A, 2B en 2C waarbij de GO/NO-GO gekozen worden op de basis van gegevens uit de experimenten: moet voor herstel van het fenotype de [redacted] dan wel verlaagd worden in het [redacted] muis model. Als een gekozen aanpak niet werkt, zal deze aanpak niet verder onderzocht worden in deze bijlage noch andere bijlagen van het projectvoorstel.

Resultaten welke verwacht kunnen worden uit experiment 1
resultaat 1A: 20% remming van de [redacted] (gebaseerd op genexpressie van [redacted] markers) en ziekte parameters (>50% verbetering op mobiliteitstesten) in de [redacted] muismodellen nemen af of blijven gelijk.
Interpretatie: Bij verbetering van de mobiliteits testen blijkt dat de [redacted] bijdraagt aan de klinische verschijnselen, histologische en moleculaire afwijkingen in de [redacted] muismodellen (tezamen aangeduid als "ziekte"). Indien er alleen remming van de [redacted] gevonden wordt, zonder verbetering in mobiliteitstesten blijkt dat [redacted] feitelijk beschermt tegen de ziekte maar mogelijk onvoldoende en dat [redacted] deze bescherming overneemt. Dit gebrek aan bescherming draagt bij aan de klinische verschijnselen, histologische en moleculaire afwijkingen in de [redacted] muismodellen.

Vervolg na resultaat 1A: bijdrage van [redacted]-gereguleerde routes aan de ziekte verder ontrafelen met een genetische interventie (door gebruik te maken van genetisch gemodificeerde muizen, beschreven in 2A) en moduleren met een farmacologische aanpak (beschreven in 2B). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [redacted] op de ziekte parameters. Specifiek kan verder onderzocht worden met een dieetgerichte aanpak, die gebaseerd is op aanpassing (verlaging) van [redacted] als [redacted] (beschreven in 2C) of de ziekteverschijnselen verbeteren.
Indien beide parameters ([redacted] [redacted] en ziekteverschijnselen verbeteren) is dat een NO-GO voor experiment 2C (wat een besparing van 1344 dieren zal opleveren). Doordat experiment I een duidelijk effect heeft op de [redacted] kunnen we in bij experiment 2A het aantal kruisingen beperken en worden 240 dieren bespaard.

Resultaat 1B: [redacted] beïnvloedt de [redacted] activiteit niet significant [redacted] [redacted] en deze activiteit is onvoldoende om de ziekte parameters te veranderen in de [redacted] muismodellen [**ziekte =**]. Het experiment levert geen bruikbare resultaten op die aantonen of de routes de ziekte veroorzaken of beschermend werken tegen ziekte.
Vervolg na resultaat 1B: In geval van resultaat 1B worden de [redacted] verder onderzocht door een [redacted] interventie met behulp van [redacted] [redacted] muizen stammen (beschreven bij experimentele opzet 2A) gecombineerd met een [redacted] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2B) of [redacted] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2C).

Resultaat 1C. Er is een kleine kans dat bij niet detecteerbare verlaging van de [redacted] door [redacted] de ziekte parameters wel significant verminderen. Dat kan bijvoorbeeld verklaard worden door een (onbekend) effect

van [redacted] mutatie op een cellulaire functie/moleculaire route, die gevoeliger wordt geremd door [redacted] dan de [redacted] Onduidelijk blijft of [redacted] bij resultaat IV een gunstig effect had op de ziekte via [redacted] (on-target of specifiek effect) of via een nog onbekende target (off-target of aspecifiek effect). Deze onduidelijkheid zal dan worden onderzocht op patiënten materiaal.
Vervolg na resultaat 1C: In geval van uitkomst 1C worden de nieuw ontdekte functie/routes die [redacted] moduleren verder onderzocht op basis van dan beschikbare gegevens uit literatuur. Indien mogelijk kiezen we voor een [redacted] interventie zoals beschreven bij 2A, 2B en 2C. De interventie is er op gericht om de nieuw ontdekte functie/route zodanig te moduleren dat de ziekteverbetering geobserveerd bij [redacted] toediening bevestigd wordt en verder ontrafeld wordt. Wij zullen de specifieke details van de interventie dan uiteraard verder bespreken met IvD. Het aantal dieren, de mate van ongerief en het doel van de experimenten zal naar verwachting niet veranderen: de resultaten zullen uiteindelijk bijdragen aan inzichten die de ontwikkeling van een multimodale therapie ondersteunen.

Resultaat vragen 2A, 2B, 2C: Uit de vervolgresultaten gegenereerd in experimenten 2A, 2B en/of 2C wordt een geschikte moleculaire target voor [redacted] geïdentificeerd in de muismodellen. In dat geval willen we een laatste proef uitvoeren die sensitief de genexpressie meet in selectief die cellen die verantwoordelijk voor ziekte zijn zoals bepaald in bijlage 1 ([redacted]) en waarbij het [redacted] niet langer aanwezig is (bepaald in aanpak 2A). Deze proefopzet is beschreven bij vraag **3**. We kunnen met dit experiment bevestigen of eerder vastgestelde afwijkingen in genexpressie cel-specifiek worden bevestigd en gecorreleerd kunnen worden aan ziekte parameters.

Vraag 3: Wat gaat er cel-specifiek mis als gevolg van de [redacted] mutatie op het niveau van [redacted] expressie en [redacted] en functies? Dit wordt onderzocht in een muismodel waarin de [redacted] cel-specifiek gelabeld zijn met een extra stukje [redacted]). Deze [redacted] staat toe dat we cel-specifiek de [redacted] bepalen in een kruising tussen de c[redacted] muizenlijn met de zieke [redacted] muis en eenzelfde kruising met de bij 2A gekruiste [redacted] waarbij herstel optreedt. Uit deze gegevens kunnen we dan onomstotelijk vaststellen wat er [redacted] mis gaat als gevolg van de [redacted] mutatie op het niveau van genexpressie en [redacted] en functies. Door deze proef komen alle gegevens samen en beantwoorden we de onderzoekvraag concreet (hoe mutaties in [redacted] leiden tot het [redacted], wittestofpathologie en klinische verschijnselen in [redacted] muizen). Voor ontwikkeling van een [redacted] kan dan verder gezocht worden naar een cel-specifieke moleculaire tool.

Het resultaat van 2A, 2B, 2C en 3 samen zal tot identificatie van een moleculair therapeutische interventie leiden die geschikt is voor verdere ontwikkeling voor de humane patiënt.

Uitkomst parameters voor alle vragen (1, 2A-C en 3) in detail met in bold de primaire uitkomst parameters:
In vivo en ex vivo zal onderzocht worden of mutant [redacted] een aangrijpingspunt is van o.a. [redacted] Onderzocht zal worden of de gemoduleerde [redacted] en [redacted] routes de onderstaande parameters beïnvloeden. Na het vaststellen van een behandeleffect (of na de maximale behandelduur) worden de hersenen en overige organen (o.a. oog, ruggenmerg, hart, lever, alvleesklier, nieren, milt, testis/ovaria, dijbeenspier, stukje huid voor fibroblastenkweek) na cervicale dislocatie of na anesthesie en in-vivo perfusie uitgenomen voor verdere analyses.

- Klinische fenotypering door middel van dagelijkse observaties, wegen en [redacted]. Zodra er een significant verschil wordt gemeten stopt het experiment.
- Pathologie van uitgenomen hersenen (immuun) histologie: [redacted], [redacted]);
- Genexpressie in hersenen (moleculaire analyses: [redacted]);
- Genexpressie en celmorfologie in overige organen (bijv. lever, nieren en pancreas) voor analyses van eventuele neveneffecten van de interventies.

De bovengenoemde (vervolg) experimenten zijn hieronder opgesplitst in twee tabellen. **Tabel 1** beschrijft het nu al lopende experiment. **Tabel 2** bevat de interventies bij de hierboven besproken verschillende type

experimenten: [redacted] aanpak (2A), [redacted] interventies dmv kruisingen (2B) en [redacted] aanpak (2C). Experiment 2 omschrijft de samenvatting wat bij de interventie d[redacted] wordt uitgevoerd.

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.

Tabel 1: Interventies bij experiment 1: [redacted] modulatie van de [redacted]

Interventie door middel van [redacted]	**Toedienings-Route, frequentie**	**Behandelduur**
[redacted] test groep* of controle groep	I.P. 1x per dag*	Max. 12 maanden
mobiliteitstesten	Max. 4	Max. 5 minuten per test
Bloedafnames (wangprik of staart max volume enkele druppels)	Max. 2x, met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname

***) N.B. Nogmaals,** dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 ivm de fok van voldoende dieren voor experiment. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een (tijdrovend) amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

***Toelichting:**
Dieren worden dagelijks i.p. met [redacted] of controle vehiculum behandeld gedurende maximaal 6 maanden (voor de [redacted] muizen) of maximaal 12 maanden (voor de [redacted] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken (presymptomatisch). Er is ruime ervaring met het zeer langdurig i.p. injecteren van muizen, waarbij retrospectief samen met de IvD het ongerief op matig is vastgesteld. [redacted] wordt in zuivere vorm en in farmacologisch geschikt oplosmiddel toegediend, zodat verklevingen in de buikholte worden voorkomen. De [redacted] muis vertoont het [redacted] fenotype op een eerdere leeftijd waardoor effecten sneller zichtbaar zijn, maar ook de kans bestaat dat eerder een humaan eindpunt moet worden toegepast. De [redacted] muis vertoont het fenotype op een latere leeftijd, waardoor effecten pas na langere tijd duidelijk zichtbaar zijn.

Tabel 2: Overzicht van behandelingen uitgevoerd in experimenten 2A, 2B, 2C en 3.

Experiment en interventie	**Interventie**	**Frequentie**	**duur**
2A: [redacted] behandeling	injectie i.p. oraal of s.c.	1x daags	Max. 12 maanden
2B: [redacted] interventies	[redacted] muizenstammen; dagelijkse observaties	Mobiliteitstesten	1 jaar of HEP
2C [redacted] interventies	Aangepast [redacted]	Dagelijks	Max. 1 jaar
2A, 2B, 2C	mobiliteitstesten	Max 4 x	5 minuten per test
2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max 2 x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname
2 A, 2B, 2C	Terminale anesthesie, uitname organen		
3	Toedienen [redacted] als [redacted] of controle vehiculum	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden
3	[redacted]	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden
3	mobiliteitstesten	Max 4 x	5 minuten per test
3	bloedafnames	Max 2 x (wangprik of	Max 5 minuten per

		staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	afname
3	Terminale anesthesie, uitname organen		

Toelichting interventies:

- **Mobiliteitstesten (max licht ongerief)**
  Mobiliteitstesten (o.a. [redacted]) zoals door ons eerder gepubliceerd.

- **Bloedafname tbv analyse farmacon/dieet:** de concentratie farmacon wordt tijdens het experiment in bloed (afgenomen middels 1-2 wangprikken) bepaald en aan het einde in bloed en in de hersenen aan het einde van het experiment gemeten (terminaal bloedmonster).

- [redacted]
  Dieren worden met een [redacted] behandeld waarin [redacted]scomponenten zijn aangepast (bijvoorbeeld [redacted]) vanaf jonge leeftijd tot een leeftijd van maximaal 6 maanden (voor de [redacted] muizen) of maximaal 1 jaar (voor de [redacted] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. De [redacted] muis vertoont het VWM fenotype op een eerdere leeftijd waardoor effecten sneller zicht baar zijn. De [redacted] muis vertoont het fenotype op een later leeftijd, waardoor effecten pas na veel langere tijd duidelijk zichtbaar zijn. Dagelijkse tot wekelijkse observaties van de dieren afhankelijk van dieet (bij dagelijks voerafwegingen ook dagelijkse observatie van gewicht en diergedrag).
  Toelichting: [redacted] activiteit en de gereguleerde [redacted] worden indirect gereguleerd door [redacted] In een pilot hebben wij [redacted] muizen 3 weken lang op een [redacted] geplaatst ([redacted] Wij vonden toen geen [redacted] in de hersenen, mogelijk als gevolg van 2 oorzaken: [redacted] zijn onvoldoende [redacted] of het [redacted] is niet geschikt om [redacted] in de hersenen te moduleren. Wij willen het experiment uitvoeren met een verdere verlaging van [redacted] en verdere verfijning door [redacted]. In het kort komt dit neer op: start [redacted] vanaf een leeftijd van 7 weken of ouder. Het gewicht van de muizen en dagelijkse tot wekelijkse voedselinname zal bijgehouden worden.

- **Ex-vivo analyses op breintjes** mbv (immuun) histologie en gen/eiwit analyses [redacted]). Breintjes worden histopathologisch geanalyseerd. Met de resultaten uit bovengenoemde experimenten kunnen we uitzoeken of de [redacted] interventie gunstig of ongunstig zal zijn op [redacted] pathologie.

Toelichting experiment 3

We kunnen met de gegevens uit bijlagen 1, 2 (experimenten 2A-C) en 3 een verfijning aanbrengen in de genexpressie analyse om een duidelijke afwijking van een moleculaire route specifiek in de aangetaste cel-populatie in het [redacted] brein (bepaald in bijlage 1). Deze kennis kan bijdragen aan een verdere ontwikkeling van de [redacted] therapie. Het ontrafelen van deze [redacted] afwijking kan bijvoorbeeld uitgevoerd worden via een kruising van de [redacted] met een [redacted] muizenlijn die conditioneel een label [redacted] heeft. De conditionele aanpak is bepaald in bijlage 1. De [redacted] kunnen we bijvoorbeeld middels kruising van [redacted] specifiek tot expressie brengen in de primair aangedane cellen (in het geval van het [redacted]). Deze kruising staat toe dat we [redacted]. Dit experiment is conditioneel aan de bevindingen uit bijlage 1 (welk [redacted] lijn bootst het best de [redacted] ziekte in muizen na) en uit bijlage 2 (onderdeel 2A-C). In een pilot zullen we de specificiteit van de [redacted] bepalen middels histologie. We zullen de lijn bij GO (voldoende [redacted] expressie) door de tijd volgen en de analyses uitvoeren op 3 leeftijden (1-2 maanden [presymptomatisch], 4-5 maanden [mild symptomatisch], maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). Bij de laatste leeftijd zullen we ook mobiliteitstesten uitvoeren.
Dit laatste experiment geldt als "proof of the pudding" waarbij eerder vastgestelde afwijkingen in [redacted] worden bevestigd en [redacted] gecorreleerd kunnen worden aan ziekte

parameters.

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

In het algemeen geldt voor de experimenten in deze bijlage:

N=16 per testgroep voor mobiliteitstesten (op grond van literatuur gegevens ([redacted]), waarvan na afloop n=11 - 12 door cervicale dislocatie worden geëuthanaseerd voor moleculaire analyses en histologie op vers weefsel en n=4 voor perfusie onder anesthesie [voor histologische analyses] (totaal n=16). Het aantal zal worden bijgesteld als de data van het experiment 2A bekend zijn en opnieuw een powerberekening gemaakt kan worden.

Power analyse van analyse van genexpressie voor pilot vermeld bij 2A:
De [redacted] analyse methode voor [redacted] is het moeilijkst meetbaar voor target [redacted]. Wij willen een verschil van 15% kunnen meten (wt en mutant verschillen zonder interventie 20% van elkaar). De standaard deviatie is 0,001772, gemiddelde expressie in [redacted] dieren is 0,025667. Op basis van deze getallen komen wij op een noodzakelijk aantal dieren van 4.

B. De dieren

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

Diersoort: muis (mus musculus) en genetisch gemodificeerde dieren, afkomstig van leveranciers of onderzoeksgroepen of eigen fok.
Muizenstammen:
Controle stammen: C57BL/6J, [redacted]
Kruisingen: C57BL/6J x test lijn, [redacted] x test lijn en [redacted] x test lijn
Testlijnen: bijvoorbeeld [redacted]
Deze muizenlijnen hebben van zichzelf geen fenotype.

Herkomst: eigen fok of aanschaf via officiële leverancier of onderzoeksinstituut.
Sekse: mannetjes. Een van de parameters is [redacted]. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons inziens noodzakelijk.

Tabel 3: Totaal aantallen dieren:

Experimenten	Minimum aantal	Maximum aantal
1	68	68
2A	96	168 + 672
2B	96+48	720
2C	384	1344
3	12	12 + 96
Totaal	**704**	**3080**

Aantallen en levensstadia worden hieronder uitgelegd per experiment.

Experiment 1:
De dieren gebruikt in experiment 1 liggen vast (n=68 in totaal) omdat dit een lopend experiment betreft op

een 'oude' vergunning (<14 dec 2014). De aantallen zijn hier wel meengenomen omdat het experiment waarschijnlijk doorloopt in 2018. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken en duurt maximaal 6 maanden voor [redacted] en 12 maanden [redacted]

Experiment 2A:
Aantallen pilot:

Per kruising van [redacted] en eventueel [redacted] *x* een gen-specifieke lijn (3 test lijnen) en 3 controle lijnen C57BL/6J, [redacted] en eventueel [redacted] (6 lijnen in totaal):
Groepsgrootte: Pilot n=4, minimaal 4, maximaal 6 lijnen per kruising (maximaal 4x6=24 dieren).
Deze flow wordt minimaal voor 4 (bij resultaat 1D) en maximaal voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij Resultaat 1C) [Tabel 2a en 2b]. In totaal (alle kruisingen maximaal ingeschat):

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen, pilots 6 x 4 x 5 = 120 muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen Pilots 6 x 4 x 7 = 168 muizen;

Aantallen karakterisering nieuwe lijnen:
Controle lijnen: C57BL/6J, [redacted] en [redacted]
Testlijnen: C57BL/6J x test lijn, [redacted] x test lijn en [redacted] x test lijn
Groepsgrootte:
Aantal dieren voor overleving en mobiliteitstesten is n=16 per groep. Deze flow wordt maximaal voor vijf kruisingen (bij Resultaat 1A of 1C) of voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij GO Resultaat 1B).

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen, 6 x 16 x 5 = 480 muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen: 6 x 16 x 7 = 672 muizen;

Als twee of meer lijnen tegelijk gekruist kunnen worden, kunnen de F1 van de kruisingen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 controle groep. Deze opzet vermindert het aantal dieren met 48 (1 controle groep is 48). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten of de kruisingen tegelijk kunnen worden uitgevoerd.

In de lijnen worden de ziekteparameters onderzocht vanaf een jonge leeftijd tot een maximale leeftijd (1 jaar voor [redacted] en C57BL/6J en 6 maanden [redacted]) of eerder bij humaan eindpunt.

Experiment 2B:
Per experiment 3 behandelingen: 2 controle (vehiculum en farmaconspecificiteit) en 1 testbehandeling (stof als [redacted]). Gebruikte Lijnen: 2 Testlijnen: [redacted] en [redacted]: n=16 (mobiliteitstesten) per groep,
2 Controle lijnen: C57BL/6J en bijv [redacted] x target-gen omlaag: n=8 per controle groep per behandeling,
Aantal dieren is maximaal: 3 x 2 x 16 = 96 dieren (test) en 3x 2 x 8 = 48 (controle) is totaal maximaal 144 dieren per experiment. Er zullen maximaal 5 verschillende experimenten worden uitgevoerd: 144*5= 720 dieren. Als een vehiculum gedeeld kan worden ([redacted]), kunnen 2 stoffen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 vehiculum injectie controle groep. Dit scheelt dan 48 dieren (2 controle groepen van 8 en 2 lijnen uit test groep van beide 16 => 2x8+2x16=48). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten welke stoffen we gaan testen.

Experiment 2C:
Per experiment 3 lijnen: 1 controle lijn: C57BL/6J en 2 test lijnen: [redacted] en [redacted] Dieraantallen: n=16 (mobiliteitstesten / overleving per groep.
Behandelingen: Maximaal 18 test behandelingen, zoals bijv. dieet eiwitverlaging >30% (2 concentraties) en dieet zonder essentieel aminozuur (4 aminozuren, 4 verschillende concentraties).
Minimaal 2 maximaal 10 controle behandelingen: normaal dieet, calorisch afgestemd dieet.
Mogelijk is het niet logistiek haalbaar om dit in 1 experiment uitvoeren en zullen we het experiment opsplitsen in 5 onderdelen (per onderdeel 2 eiwitconcentraties of 1 aminozuur in 4 concentraties). Het aantal controle behandelingen neemt dan toe van 2 naar 10.
Totaal aantal dieren is minimaal (alles parallel, met gedeelde controle behandelingen):
3 lijnen x 20 behandelingen x 16 dieren (n=960)
Totaal aantal dieren is maximaal (5 rondes, met 10 controle behandelingen):
3 lijnen x 28 behandelingen x 16 dieren (n=1344)

Experiment 3:
Ribotag met 3 testlijnen:
[redacted] x [redacted], C57Bl/6J x [redacted], Lijn 2A x [redacted] x conditionele-CRE x [redacted] en 3 controle lijnen (alleen voor pilot): [redacted] C57BL/6J en de lijn die uit 2A komt (Lijn 2B x *2b5*^{ho})

- Pilot experiment (is [redacted] celspecifiek en beïnvloedt de [redacted] de expressie van de [redacted] Per groep: 2 dieren per lijn, 1 leeftijd 4-5 maanden oud. Histologische analyse (aantonen

of de cellen specifiek de [redacted] tot expressie brengen). Aantal dieren is 2 dieren x 6 lijnen=12 dieren.

- **Als** de [redacted] zoals verwacht [redacted] komt en geen onverwacht ongerief geeft, **dan** zal [redacted] analyses in hersenen van mannelijke dieren worden uitgevoerd op de 3 testlijnen, met 8 dieren per lijn, 2 leeftijden ((1-2 maanden [presymptomatisch], 5 maanden [mild symptomatisch], en 16 dieren voor mobiliteitstesten per lijn bij leeftijd maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). 8 dieren zijn naar alle waarschijnlijkheid nodig voor het isoleren van [redacted] (eerder hebben we [redacted] op heel brein [redacted] uitgevoerd op n=4). Aantal dieren is 8 dieren x 3 lijnen x 2 leeftijden + 16 x 3 x 1 leeftijd= 96 dieren.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

[redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast is het niet wettelijk toegestaan noch ethisch verantwoord om [redacted] bij mensen toe te passen indien proefdieronderzoek niet heeft uitgewezen dat de middelen veilig en effectief zijn. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden [redacted]); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

Vermindering:

Bij het creëren van nieuwe lijnen door kruisingen (2A, 3) zal een Pilot experiment in n=4 per lijn worden uitgevoerd om afwezigheid van extra ongerief te bevestigen. We beslissen dan of de [redacted] lijn [redacted] noodzakelijk is om te genereren, waarbij we snel tot een keuze komen welke genetisch gemodificeerde muizen voor verdere analyses gebruikt worden.

Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Door kruisingen van verschillende lijnen tegelijk uit te voeren kunnen we het aantal controle dieren terugbrengen met 48. Bij farmacologische interventie studies zal waar mogelijk een naïeve, onbehandelde groep (controle groep) dier worden weggelaten indien ook een groep dieren met een passend vehiculum als saline wordt meegenomen. Dit alles zal met de IvD worden afgestemd.

Verfijning

Zodra blijkt dat fenotypische veranderingen na interventie significant worden waargenomen zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar 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.

Het neurologisch fenotype van muizen met [redacted] uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren makkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

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.

Mannelijke dieren worden solitair gehuisvest ivm onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting.

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?

Het dagelijks i.p. behandelen wordt door zeer ervaren biotechnici uitgevoerd, waarbij is vast gesteld dat het meeste ongerief wordt veroorzaakt door oppakken van de dieren. Retrospectief werd daarbij het ongerief op maximaal matig (na maanden toedienen) vastgesteld. Er worden geen complicaties verwacht doordat de farmaca zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken farmaca ongerief veroorzaken. Het fenotype [redacted] is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Kenmerken van [redacted] ziekte in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water) en geringe gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren. Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.
In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

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.

- Maximaal dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren.
- Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
- De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.

In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies.
Het fenotype [redacted] is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Bij het samenstellen van het werkprotocol zal hier gedetailleerd over gecommuniceerd worden met de IVD.

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

Ca. 20%: zou maximaal verwacht kunnen worden bij [redacted] die worden behandeld met controle [redacted] of vehikel of die geen genetische aanpassing hebben.

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.

Inschatting ongerief per experiment:

Tabel 4: Inschatting ongerief per handeling:

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur	Maximaal ongerief
1 & 2A: [redacted] behandeling	injectie i.p. oraal of s.c.	1 * daags	Max 12 maanden	Licht of matig; afhankelijk van de duur. Zodra er een effect wordt gezien stopt de behandeling
2B: [redacted] interventies	[redacted] muizenstammen; dagelijkse observaties	Motorische testen	Max. 12 maanden	licht
2C [redacted] interventies	Aangepast [redacted]	Dagelijks	Max. 1 jaar	licht
1, 2A, 2B, 2C	mobiliteitstesten	Max. 4x	5 minuten per test	licht
1, 2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max. 2x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname	licht
1, 2 A, 2B, 2C	Terminale anesthesie, uitname organen			Maximaal licht
3	Toedienen [redacted] of controle vehiculum	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden	licht of matig; afhankelijk van de duur. Zodra er een effect wordt gezien stopt de behandeling
3	[redacted]	s.c., oraal of i.p., max dagelijks	Max. 12 maanden	licht
3	mobiliteitstesten	Max. 4x	5 minuten per test	licht
3	bloedafnames	Max. 2x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname	licht
3	Terminale anesthesie, uitname organen			
1, 2A, 2B,2C, 3	Fenotype als gevolg van mutatie	Geen	Max 12 maanden	Licht of matig, afhankelijk van genotype en duur experiment

Tabel 5: Maximale cumulatieve ongerief in % van gebruikte dieren in deze bijlage

Aantal dieren	% met ongerief "licht"	% met ongerief "matig"
Maximaal 3080	Max. 60%	Max. 40%

De behandelingen zijn in principe gericht op verbetering van het fenotype van [redacted] en [redacted] lijnen.

Vóórdat ernstig ongerief optreedt zullen de muizen geëuthanaseerd worden (=HEP), het totale ongerief is dus maximaal matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De hersenen moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyse.

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.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3 Type dierproef: Verbetering van [redacted] functie: ex-vivo analyses na [redacted] in celkweek

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

We willen de mRNAs/eiwitten opsporen die een veranderde expressie vertonen in muizen met [redacted] ten opzichte van wild-type (WT) dieren, omdat deze mogelijk een rol spelen bij de ziekte. Dit gebeurt met ex-vivo analyse van patienten matereiaal en in parallel met muizen materiaal.

Ex-vivo onderzoek op hersenen van onbehandelde muizen met [redacted] en WT controles:

A1&3: Ex-vivo (in celkweek) worden de volgende parameters onderzocht op coupes van hersenen uit muizen [redacted]:

- de mate van schade, [redacted];
- specifiek de mate van [redacted] uitrijping in celkweken met [redacted];
- [redacted] door karakterisatie van celmorfologie en [redacted] door middel van fluorescentie immuunhistochemie.

A2: Ex-vivo [redacted] analyse met behulp van [redacted] uit muizen van verschillende leeftijden/ziektestadia in [redacted]).

- Eiwit detectie welke differentieel tot expressie worden gebracht [redacted]. Hierbij wordt bepaald welke eiwit(ten) veranderd is (zijn), [redacted].
- **Belangrijk is de translationele aanpak:** Om de resultaten die we in de muizen vinden te

valideren zullen we eenzelfde [redacted] protocol uitvoeren op menselijk materiaal ([redacted]) en onderzoek doen naar het proteoom van [redacted]

B: Wat is de impact van [redacted] op innate immuun cellen (mbv celkweek): uitleesparameters: [redacted] wordt bepaald met immuun fluorescentie, [redacted]. Daarnaast zullen de zelfde experimenten worden uitgevoerd met primaire [redacted] van patiënten en controles; de cellen zijn al aanwezig in het lab.

C: Wat is de impact van [redacted] op de Bloed Hersen Barrière (BHB)? Dit betreft ex-vivo onderzoek op breintjes van muizen met [redacted]. Uitleesparameters: verschillende parameters [redacted]

D1 Bestudering van [redacted] na behandeling [redacted]. Primaire uitkomst parameters: astrocytaire levensvatbaarheid, morfologie, reactiviteit en proliferatie kwantificatie met behulp van [redacted], [redacted]. 3D kweken zijn geschikt voor al deze doeleinden en de technieken en analyses al geoptimaliseerd.

Go / no-go: als AI en AII geen significant resultaat laat zien

A4: In-vivo inductie het [redacted] in vivo bestudeerd bij [redacted] en WT muizen waarbij myelineschade door lokale steriele in het corpus callosum en de cerebellaire witte stof met een standaard protocol[1] met [redacted] of 2µl PBS (controle) i geinduceerd.

- Uitleesparameters: ex-vivo op hersen materiaal:
  - cellulaire veranderingen zijn ([redacted]) dagen na [redacted] tijdstippen zijn gebaseerd op de bekende timeline van [redacted] in muizen.
  - Differentiële expressie van geselecteerde eiwitten
-

In-vivo onderzoek op hersenen van behandelde muizen met [redacted] en [redacted]

D2: **in-vivo:** onderzoek naar [redacted] vs. controle dieren. Uitkomst parameters: [redacted]) op coupes van hersenen. Na de behandeling wordt per tijdspunt een deel van de muizen geëuthanaseerd en zullen de hersenen histologisch worden onderzocht.

Haalbaarheid: Alle noodzakelijke apparatuur is beschikbaar, en technieken en analyses zijn al geoptimaliseerd. Daarnaast zal de differentiële expressie in [redacted] en [redacted] muizen van [redacted] ook in het [redacted] uit punt A bevestigd worden. We willen muizen van verschillende leeftijden analyseren ([redacted].

Translationeel: Daarnaast worden dezelfde experimenten uitgevoerd met [redacted] patiënten en controles. Deze cellen zijn al aanwezig in het lab om de muisdata met de humane situatie te vergelijken en de ziekte-specificiteit van de bevindingen te bepalen.
Wij verwachten dat [redacted]. Wij zullen aantonen of een afwijkende eiwitexpressie hieraan ten grondslag ligt.

Humaan: de bevindingen van bovengenoemde experimenten zal worden bevestigd in menselijke [redacted] hersenweefsel en de specificiteit zal worden beoordeeld door [redacted].

Uit de experimenten uit bijlage 3 moet duidelijk worden welke [redacted] responses en [redacted] bepalen.

Referenties:

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

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

Het betreft hier bijna volledig ex vivo analyses, op muizen in verschillende ziekte stadia (leeftijd) met wild type controles. De enige handeling, welke hier van toepassing is, is het doden van dieren op verschillende leeftijden om weefsel voor ex vivo analyses te verzamelen.

Tabel 1: overzicht behandelingen, frequentie en duur per experiment

Experiment	Handeling	Duur	Frequentie
A1, A3	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
A2, A4	[redacted] onderanesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Uitname organen na terminale anesthesie op verschillende leeftijd		
B	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
C	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
D1	Geen, uitname organen na terminale anesthesie		
D2	Of: [redacted]	Kort, seconden	Eenmalig
	Of: [redacted] onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	uitname organen na terminale anesthesie op		

	verschillende leeftijd		

Uitleg van behandelingen:
Dieren waarin ook in-vivo handelingen worden verricht:
Experiment A4: [redacted] in vivo (alleen als A2 en A3 geen duidelijk resultaat laat zien)
Eenmaal intracraniale behandeling [redacted].
Gebruik van [redacted] en [redacted] muizen [redacted]).
Gebruik van mannelijke dieren [redacted], en van dieren van beide geslachten voor [redacted]).

Experiment D1: 3D in vitro model van reactieve gliose
Geen behandeling in vivo, alleen uitname breinen onder terminale anesthestie.
Gebruik van [redacted] en [redacted] muizen [redacted] van beide geslachten. [redacted].

Experiment D2: [redacted] in vivo
Eenmalig behandeling [redacted] zal een deel van de muizen worden geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie en zullen de hersenen worden ingevroren of in paraffine ingebed voor microscopisch onderzoek. [redacted].

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

Uit ervaring en uit literatuurgegevens zijn de berekende aantallen gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die nodig is voor de ex-vivo analyses per parameter. Daar waar mogelijk worden meerdere parameters in een brein onderzocht. .
Voor poweranalyse: alpha 0.05, 1-beta 0.8, Zalpha/2 1.96, Zbeta 0.84.

Punt A1: [redacted] behandeling van organotypische hersenplakken.
Hersenplakjes van 300um; parameters: [redacted].
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.1/diff 0.1)^2 = **16**

Punt A2: [redacted].
Isolatie van [redacted] [redacted].
3 experimenten, 7 levenstadia, 3 breinen = 63 breinen per genotype (geen statistische overwegingen)

Validatie experimenten ([redacted])
4 breinen ([redacted])/genotype
7 levensstadia/genotype
21 breinen per genotype
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.05/diff 0.1)^2 =4 **voor validatie**

Punt A3: a[redacted] co-kweken.
De [redacted] worden uit [redacted] pups geïsoleerd (beide geslachten). Bij het aantal muizen wordt voor 1 [redacted] nestje, 1 muis (moeder) gerekend. Een [redacted] nestje (gemiddeld 6 pups) geeft ~ 6 x 10^7 cellen. Na sorting blijven er ~1.8 x 10^6 [redacted] cellen over. Om genoeg [redacted] cellen te genereren voor 1 experiment hebben we naar verwachting 2 [redacted] nestjes nodig. [redacted] worden geïsoleerd uit [redacted]

Herhaling van experiment (n): 4
Aantal muizen: (4 (n) x 2 (nestjes; [redacted] x 2 (nestje: WT + [redacted]) = 16 muizen
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.1/diff 0.1)^2 = **16**

Punt A4: [redacted] behandeling in vivo.
[redacted] (mannelijke dieren): 9 breinen (zie boven) x genotype ([redacted] en WT) x tijdstip (voor behandeling en [redacted] na behandeling) x behandeling ([redacted]).
Immuunhistochemische karakterisatie en [redacted]: 6 half breinen x genotype ([redacted] [redacted]) x tijdstip [redacted]) x behandeling [redacted]) x experiment ([redacted], dezelfde brein kan gehalveerd worden en gebruikt voor beide doelen).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.34/diff 0.1)^2 = **180** [redacted]
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.34/diff 0.17)^2 = **60 voor validatie proteoom analyse**

Punt B: [redacted] co-cultures.
We hebben [redacted] weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.
Voor imuunhistochemie: totaal 18 eiwitten, 3 eiwitten samen kleuren → 6 kleuringen; 1 time point; 4 genotype combinaties: [redacted]; N=3; 3 experimenten:
→1 time point x 6 kleuringen x 3=N x 3 experimenten = 54 wells/genotype combinatie
→1 time point x 6 kleuringen x 3=N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 216 wells totaal = 9 x 24-well plates totaal

[redacted] 1 time point; 4 condities/genotype: [redacted]; N=3; 3 experimenten:
→1 time point x 3 N x 3 experimenten = 9 wells/genotype combinatie
→1 time point x 3 N x 3 experimenten x 4 genotype combinatie = 36 wells totaal= 1.5 x 24-well plates totaal

[redacted]: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype combinaties: [redacted]; N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal= 5 x 24-well plates totaal

[redacted]: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype combinaties: [redacted]; N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal = 5 x 24-well plates totaal.

Totaal punt B: Minstens 21 x 24-well plates 123 wells / genotype combinatie; totaal 4 combinaties
→Totaal 246 wells / genotype ([redacted])

1 muis pup = ca. $3.5X10^6$ cellen, max passage (P) 2: plate 30.000 cellen/well P0-1, plate 50.000 cellen/well P2. Nodig 246 x 50.000 = $12.3x10^6$ cellen, 1 P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca. $24.5x10^6$ cellen, dus 1 nestje nodig voor een experiment. De fok voor null/null ([redacted] is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted])x null/null ([redacted] Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ([redacted] cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.
Om de drie experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes / genotype (7

pups/nestje) → 21 pups / genotype = 21 WT + 21 homozygote [redacted] + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

Punt C1: a[redacted] co-cultures.
We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.
[redacted] 3 experimenten x 6 tijdstippen [redacted]) x 2 genotypen ([redacted]) x N=3: 4.5 x 24 well plates.
[redacted]: 3 experimenten x 6 tijdstippen [redacted]) x 2 genotypen [redacted]) x N=3: 4.5 x 24 well plates.
[redacted]: 2 experimenten x 6 tijdstippen [redacted]) x 2 genotypen [redacted] x N=3 x 6 kleuringen: 18 x 24 well plates.
[redacted]: 3 experimenten x 6 tijdstippen [redacted] x 2 genotypen [redacted] x N=2: 15 x 24 well plates.

Totaal 450 wells per genotype, 900 wells voor beide genotypen = 38x24 well plates, 1 muis pup = ~ 3,5 x 10^6 cellen. Passage 2: plate 30.000 cellen / well passage 0-1, 50.000 cellen / well passage 2. Noodzakelijk 450 x 50.000 = 22,5 x 10^6 cellen per genotype, 1 P1-3 nestje geeft ~ 7 pups, 7 x 3,5 x 10^6 cellen = 24.5 x 10^6 cellen. De fok voor null/null ([redacted] is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted])x null/null ([redacted] Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ([redacted] cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment. Om alle experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes (7 pups/nestje) / genotype = 21 WT + 21 homozygote [redacted] + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

Punt C2: onderzoek naar [redacted] in vivo/ex vivo, [redacted].
Gebruik van dieren van beide geslachten; [redacted]); euthanasie door cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.
[redacted]: 10 halve breinen x genotype ([redacted]) x 3 leeftijden [redacted]): 10 X 2 X 3 = 60 halve breinen = **30 breinen** [redacted]).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.2/diff 0.25)^2 = **10**
[redacted]: 3 breinen x genotype [redacted]) x 3 leeftijden [redacted]): 3 X 2 X 3 = **18 breinen** ([redacted]
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.1/diff 0.25)^2 = **3**
[redacted]: 9 breinen (zie boven) x genotype ([redacted]) x 3 leeftijden ([redacted]): 9 X 2 X 3 = **54 breinen** (27 [redacted], 27 WT).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.26/diff 0.35)^2 **= 9**

Punt D1: [redacted] in vitro model van [redacted].
Gebruik van [redacted] en [redacted] muizen, [redacted], van beide geslachten, geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

[redacted]: totaal 18 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren → 9 kleuringen (9 plakjes); 4 tijdstippen ([redacted]); 2 condities: [redacted]; 2 genotypen ([redacted]); N=3; 3 experimenten:
→4 tijdstippen x 9 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 648 secties/genotype ; 2 secties per well; 324 wells; = **18** x 24-well platen per genotype
→18 platen x 2 genotypen (WT,[redacted]) = 36 x 24-well platen totaal

[redacted]: totaal [redacted] eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 4 tijdstippen ([redacted] 2 condities: [redacted]; 2 genotypen ([redacted]); N=3, 3 experimenten:
→4 tijdstippen x 5 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 240 kleuringen/genotype
240 = 20* 12 wells platen nodig (equivalent aan ongeveer **40** 24 wells platen) per genotype
→40 24 wells platen x 2 genotypen ([redacted]) = 80 x 24-well platen totaal

[redacted]: 4 tijdstippen [redacted] 2 condities: [redacted]

[redacted]; 2 genotypen [redacted]); N=3; 2 experimenten:
→4 tijdstippen x N=3 x 2 experimenten x 2 condities/genotype = 48 samples/genotype ; 1 sample kost 1 10 cm plaat is equivalent aan ~36 x 24 wells platen/genotype
→**1728** x 24 well plates x 2 genotypen ([redacted]) = 3456 x 24-well plates totaal

Voor alle hierboven genoemde experimenten:
Totaal minstens 1786 x24-well platen, totaal 42864 wells / genotype
50.000 cellen/well (passage P2).
Totaal aantal cellen is 42864 x 50000= 2143,2 $X10^6$ cellen/per genotype
1 muis pup = ca. $3.5X10^6$ cellen
613 pups nodig per genotype = 613 WT + 613 homozygote [redacted] + 613 heterozygote pups + 88 moeders.

P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca. $24.5x10^6$ cellen dus 88 nestjes per genotype nodig voor alle experimenten. De fok voor null/null ([redacted] is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted])x null/null ([redacted]). Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ([redacted]) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.

Punt D2: [redacted] in vivo
Gebruik van mannelijke dieren of beide geslachten afhankelijk van de experiment; [redacted]; cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.

Isolatie van [redacted]; ongeveer 50 cellen kunnen geïsoleerd worden uit een 6um-dik plakje, ongeveer 20 plakjes kunnen gesneden worden uit een brein; 3000 cellen (dus 3 hele breinen) noodzakelijk per sample voor mass-spectrometrie (n=1 bepaling).

3 experimenten x 2 genotype ([redacted] en [redacted] x 2 tijdstip ([redacted]) x 4 behandeling ([redacted]). **24 dieren per genotype**

[redacted]: 4 breinen [redacted]) x 2 genotype ([redacted]) x 5 tijdstip ([redacted] x 4 behandeling ([redacted] **80** dieren per genotype
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.05/diff 0.1)^2 =4 **voor validatie**

B. De dieren

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

Muis, *mus musculus;* Wild type: C57Bl/6J en Homozygote [redacted]*)*.
Beide stammen worden gefokt in het proefdiercentrum. Voor uitname pups op [redacted] worden de pups via hysterectomie bij de moeder uitgenomen. De moeder wordt na de hysterectomie onder anesthesie onmiddellijk gedood. Pups (P0-P2) worden spontaan geboren.

Tabel 2: berekening aantallen dieren

experiment	soort	sexe	leeftijd	aantal
A1	[redacted]	beide	perinataal	16
	wt	beide	perinataal	16
A2	[redacted]	Man*	[redacted], [redacted]	180
	wt	man*	[redacted], [redacted]	180
A3	wt	beide	[redacted]	16

	[redacted]	beide	E18	16
			Moederdier voor A1 & A#	10
A4	[redacted]	beide	voor behandeling en [redacted] na behandeling	240
	wt	beide	voor behandeling en [redacted] na behandeling	240
B	[redacted]	beide	P0-P3	21
	[redacted]	beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C1	[redacted]	beide	P0-P3	21
	[redacted]	beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C2	[redacted]	beide	[redacted]	51
	wt	beide	[redacted]	51
D1	[redacted]	beide	P0-P3	613
	[redacted]	beide	P0-P3	613
	wt	beide	P0-P3	613
D2	[redacted]	beide	[redacted]	102
	wt	beide	[redacted]	102
			totaal:	**3185**

Totaal aantal dieren voor deze bijlagen: 3185 dieren
*)
Door verschillen in o.a. eiwitexpressie van X en Y chromosomen is statistische analyse van deze experimenten ondoenlijk als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons inziens noodzakelijk.

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 is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan [redacted] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met [redacted] van patiënten [redacted]). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. [redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen. [redacted] de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

Vermindering:
De groepsgrootte is statistisch bepaald of gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die ex-vivo nodig is voor de analyses. Waar mogelijk worden breintjes gedeeld voor meerdere parameters.

Verfijning
Het betreft bijna uitsluitend onderzoek ex-vivo omdat we instaat zijn verfijnd onderzoek uit te voeren [redacted]. We hebben in onze groep veel ervaring met [redacted] in het kader van de ontwikkeling van [redacted]

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

Het neurologisch fenotype van muizen met [redacted] uit zich als een [redacted]. De muizen hebben dan problemen met [redacted]. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren gemakkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente [redacted] op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

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.

Adequate anesthesie en perioperative pijnbestrijding zal worden toegepast bij bv [redacted] en zal in het werkprotocol (OZP) worden afgestemd met de IvD.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Kenmerken van [redacted] ziekte in muizen: [redacted].

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De [redacted] is een typisch verschijnsel van een [redacted] en wordt veroorzaakt dor verdwijnen van de [redacted] uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van [redacted] van de dieren.
Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
De [redacted] afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). [redacted] Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.
In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt [redacted]).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt ([redacted]).

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

~ 1%

K. Classificatie van ongerief

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

- [redacted] onder anesthesie: matig
- Muis met fenotype (mild of matig, dit wordt achteraf bepaald en is nu als maximaal matig weergegeven) of toepassen HEP ivm progressie van aangetast fenotype: matig (om ernstig te voorkomen)
- Uitname breintjes onder anesthesie: licht

Tabel 2: aantallen dieren en inschatting maximaal ondervonden ongerief

Experiment	Licht	Matig
A1	32	
A2	280	80*
A3	42	
A4	480	
B	63	
C1	63	
C2	102	
D1		1839
D2	102	102

** Dit betreft muizen met ongerief als gevolg van behandeling en/of fenotype bij de [redacted] muizen.*

Het cumulatieve ongerief is licht voor 1164 muizen (~ 37%).
Het cumulatieve ongerief is matig voor 2021muizen (~ 63%).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het isoleren van de verschillende celtypen uit de breintjes

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

7.

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.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 4 Type dierproef: Behandeling van [redacted] in muizen met stamcellen, en/of combinatie therapie (van stamcellen, farmacologische modulatie van micromilieu en [redacted])

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

[redacted] is aanwezig in alle regio's van de hersenen, maar varieert in ernst in de diverse fenotypen. [redacted] Onderzoek in muismodellen heeft laten zien dat [redacted] van [redacted] [redacted] kunnen geven[1]. Vervanging van de niet-functionerende [redacted] in patiënten met [redacted] biedt dus therapeutische mogelijkheden. Deze therapie is echter nog in een [redacted], niet getest in muismodellen voor de humane ziekte en nog niet geschikt voor toepassing in patiënten.

Op dit moment hebben we met muismodel met de mutatie in [redacted] een model dat de humane ziekte klinisch goed weergeeft. Eerste experimenten in ons lab hebben aangetoond dat we ook in staat zijn om in dat model de [redacted].
Daarnaast hebben we de [redacted]) en [redacted]) technologie geïntroduceerd die de mogelijkheid biedt om een verbeterde [redacted] populaties te maken. [redacted] is een nieuwe technologie die het mogelijk maakt om [redacted] De patiënt [redacted] of [redacted] kunnen we vervolgens differentiëren naar onze cellen van interesse, [redacted] Een belangrijk voordeel van [redacted] is, dat we niet meer afhankelijk zijn van [redacted] die ethische problemen met zich brengen en dat [redacted] derivaten niet worden afgestoten door de patiënt na [redacted]
Naast het meer fundamentele onderzoek beschreven in bijlagen 1 – 3 zal dit onderzoek zich dus richten op de behandeling van [redacted] met behulp van [redacted].

Er zal gebruik gemaakt worden van de [redacted], verder te noemen [redacted] [redacted] [redacted] wanneer resultaten van de resultaten uit bijlage 1- 3 daar aanleiding toe geven).
Gezonde [redacted] cellen, afkomstig uit controle muizen [redacted]) of geproduceerd via de [redacted] [redacted] zullen [redacted] worden [redacted] om zodoende te kunnen uitgroeien tot functionele [redacted] die wel in staat zijn om de aangetaste [redacted] te repareren.
De effectiviteit van de behandeling wordt gemeten door het verbeterde motorisch gedrag te meten op volwassen leeftijd. Daarnaast zullen de dieren op verschillende tijdstippen na de [redacted] worden geëuthanaseerd. De hersenen zullen deels vers verzameld worden voor de analyse van veranderingen in [redacted] en [redacted] [redacted], maar deels ook [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted]-/[redacted]
Daarnaast kan farmacologische therapie van [redacted] invloed hebben op [redacted] en onderdeel zijn van behandeling. Tenslotte hebben recente onderzoeken aangetoond dat een [redacted] [redacted] kan bijdragen aan slecht herstel van de [redacted] en dat [redacted] therapie nieuwe perspectieven biedt voor hersenaandoeningen.
Bekende [redacted] componenten in het micromilieu van [redacted] patiënten, als ook nieuwe gegevens over [redacted] [redacted] uit onderzoeken beschreven in bijlagen 1 – 3, worden getarget om de uitkomst van [redacted] te verbeteren. Ook zullen de effecten van [redacted] correctie in vivo, mbv [redacted] van lentivirale vectoren die een normaal [redacted] tot expressie brengen, worden getest. Farmacologische behandeling en [redacted] zal voor, tijdens of na [redacted] worden toegepast. De dieren worden geanalyseerd zoals hierboven beschreven.

Fenotype in de gebruikte dieren in vergelijking met de humane patiënt:
Bij mensen veroorzaken homozygote mutaties in [redacted] (autosomaal recessief overervend) een [redacted]. Menselijke dragers (ouders, eventuele drager-familieleden) hebben geen verschijnselen. Alleen personen die twee mutaties hebben, krijgen de ziekte. [redacted] leidt vooral tot een verlies van motorische vaardigheden (vooral stoornis van de coördinatie = ataxie). De cognitieve vaardigheden zijn relatief gespaard. [redacted] leidt tot vroegtijdig overlijden, vaak na een periode van coma. Het ongerief bij [redacted] patiënten is gering; de motorische afwijkingen geven geen pijnmaar de belasting is zeer ernstig door de beperkingen. Als de ataxie op jonge leeftijd ontstaat, ervaren de kinderen hun motoriek als "normaal". Bijna alle patiënten hebben epilepsie, soms een status epilepticus. Aangezien epileptische aanvallen bij [redacted] vrijwel altijd met verlies van bewustzijn gepaard gaan, merken patiënten over het algemeen niets van hun aanvallen.

- Muizen met één mutatie zullen, net als menselijke dragers, naar verwachting geen enkel ongerief ondervinden. Voor [redacted] is de verwachting dat muizen die twee mutaties hebben vooral motorisch ongerief ondervinden.
- Bij de [redacted] [redacted] [redacted]) muizen beginnen de motorische veranderingen pas na [redacted] maanden. Op dat moment is het ongerief gering. De dieren verzorgen zichzelf goed, eten normaal en planten zich voort. Op [redacted] maanden, worden de dieren wel uit de fok gehaald.
- Dieren worden vanaf [redacted] maanden extra gemonitord. Extra monitoren houdt in dat de dieren wekelijks worden 1) gewogen; 2) onderzocht op verzorging, huid en staart; 3) [redacted], [redacted] Dit wordt bijgehouden in een logboek. Bij belangrijke gewichtsafname (meer dan 15% van eigen lichaamsgewicht in 2 weken), verlaagde voedselinname of verminderde verzorging zal het dier meteen worden geëuthanaseerd (=humane eindpunt) waardoor ernstig ongerief wordt voorkomen.

Uitkomst parameters: [redacted] (bepaald door [redacted] testen), [redacted] [redacted] [redacted].

Referenties

1. [redacted]

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

De dieren worden [redacted], of saline ter controle. De farmacologische behandeling door het toedienen (oraal, sc of ip) van farmaca als onderdeel van de multimodale therapie hangt van de factoren die komen uit het onderzoek beschreven in bijlagen 1-3 of

ander onderzoek.
De dosis en de frequentie hangen en de toedieningsroute is afhankelijk van het farmacon (geselecteerd uit bijlage 2 of de literatuur) met een wekelijkse behandeling met een duur van 2 – 5 maanden. Dit zal per werkprotocol met de IvD worden afgestemd.

Tabel 1: overzicht handelingen

A. handeling	**B: Frequentie**	**C. duur**
[redacted] injectie	eenmalig	10 min.
Farmacologische behandeling, p.o. s.c of i.p.	1 x dag of 1 x week	Max 5 mnd
[redacted]	Max 3 maal	Max 5 min per test
[redacted]	Max 3 maal	Max 5 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 5 min per test
Doden	1 maal	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4mnd		2-6 maanden

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

Door de multidisciplinaire aanpak van dit project kan met een minimale fok (en dus zo min mogelijk surplus dieren) het onderzoek worden uitgevoerd. Op basis van de experimenten beschreven in bijlagen 1 – 3 kan een goede keuze worden gemaakt voor het optimale model en de optimale keuze van farmaca.

Hoofd parameter is de histopathologie om aan te tonen dat de [redacted] zich heeft hersteld.
Verwachte uitkomst: Wij verwachten dat de [redacted] een verminderd fenotype geven van onze [redacted] muis, aangezien [redacted]

Gebruik per jaar per lijn
Testen van farmaca:
[redacted] BL6 muizen:

- ⇨ [redacted] worden gebruikt omdat zij tijdens het leven geleidelijk aan een [redacted] gaan vertonen en zo de mogelijkheid geven om het effect van de behandeling te volgen.
- ⇨ Behandelde dieren worden op 3 leeftijden bestudeerd: [redacted] (pre-klinisch symptomatisch); [redacted] (klinisch symptomatisch); [redacted] (evident klinisch symptomatisch). Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- ⇨ 2 behandelgroepen: vehicle + compound, deze compounds zijn geselecteerd uit eerder onderzoek of nieuwe resultaten uit bijlage 1-3. De compound zal als zuivere stof in een farmacologisch vehicle worden toegediend.
- ⇨ Het te isoleren materiaal voor verdere analyse dient verschillend verzameld te zijn: vers en na perfusie (onder anesthesie)
- ⇨ Berekening van aantal dieren:
  Gebaseerd op eerdere studies is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:
  [redacted]
- ⇨ 7 dieren per groep
- ⇨ Aantal dieren: 3 leeftijden x 2 behandelgroepen x 2 weefselgroepen x 7 dieren/groep= 84 dieren per experiment
- ⇨ Ivm met opvolgen van dieren achten we dat max 2 compounds per jaar getest kunnen worden: 84 x 2 = 168 dieren
- ⇨ Aantal interventies: 2 interventies per jaar en maximaal 10 interventies per 5 jaar.

Testen van [redacted] in combinatie met [redacted]:

[redacted] *BL6:*

- ⇨ Behandelde dieren worden met de volgende therapievormen behandeld: 1) [redacted] / [redacted] ([redacted] 2) genconstructen [redacted]
- ⇨ [redacted]
- ⇨ Berekening van aantal dieren:
  Gebaseerd op eerdere studies ([redacted]) waarbij ook is gekeken naar verbeterd [redacted] van muizen met een [redacted] na behandeling met [redacted]
- ⇨ 20 dieren per groep, maar omdat dat in de praktijk niet haalbaar is worden experimenten om praktische redenen sequentieel uitgevoerd op basis van nesten.
- ⇨ Aantal dieren: 3 leeftijden ([redacted]) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 dieren per groep = 120 dieren
- ⇨ Om logistieke redenen worden er niet meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd. Maximaal aantal pups dat er per maand geïnjecteerd wordt: 8 (nestjes per maand) * 6 (± dieren per nestje) = 48 dieren
- ⇨ Voor iedere conditie (binnen 1 experiment) wordt 1 nestje gebruikt; het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. De resterende dieren worden verzameld voor biobanking.
- ⇨ Per jaar wordt er maximaal getest: 48 (dieren per maand) * 12 (maanden per jaar) = 576 pups
- ⇨ Berekening van aantal interventies per jaar: 576 pups / 120 (dieren per experiment) = 4,8
- ⇨ Aantal interventies: 4-5 interventies per jaar en 20-25 interventies per 5 jaar.

Genereren van celpopulaties:

<u>Genereren van muis donorcellen:</u>

C57BL/6J muizen:

- ⇨ De gezonde muis voorlopercellen worden uit E18 C57BL/6J pups geïsoleerd. Voor de isolatie van voorlopercellen worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.
- ⇨ Onze experimenten hebben aangetoond dat we uit een [redacted].
- ⇨ Aantal dieren: 576 (pups per jaar) / 12 (dieren per injectie) * 1/3 (injecties met muiscellen) * 12 (pups) = 192 E18 pups per jaar.

<u>Genereren van humane donorcellen:</u>

RAG2null *BL6* muizen:

- ⇨ [redacted]
- ⇨ De parameters (cel analyses) worden op twee leeftijden: [redacted]) geanalyseerd;
- ⇨ Voor iedere leeftijd injecteren we 3 dieren. Ondanks dat 1 succesvol geinjecteerd dier volstaat, houden we rekening met experimentele variatie: [redacted]
- ⇨ Iedere goed-geteste [redacted] is genoeg voor de injectie van 30 dieren.
- ⇨ Per jaar worden maximaal 576 dieren getransplanteerd; 2/3 vd experimenten worden met [redacted] geinjecteerd. 576 * 2/3 / 30 = 12,8 [redacted] batchen per jaar

⇨ Aantallen: 12,8 batches * 2 (leeftijden) * 3 (dieren/leeftijd) = 76,8 (77) dieren per jaar

B. De dieren

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

Diersoort: muis (Mus musculus) en genetisch gemodificeerde muizen.

Herkomst: alle dieren worden in het proefdiercentrum gefokt onder SPF condities.
De homozygote mutanten worden gegeneerd met de [redacted]
Er worden [redacted] gebaseerd op resultaten uit bijlagen 1 – 3), [redacted] en WT C57BL/6J muizen gebruikt. Wanneer humane progenitor cellen worden geïnjecteerd, zullen [redacted] muizen op een [redacted] achtergrond worden gebruikt omdat anders de getransplanteerde cellen worden afgestoten. [redacted].
C57BL/6J muizen worden gebruikt om controle progenitor cellen te isoleren. [redacted]
De behandeling van de [redacted] dieren zal vanaf P0 starten. Het precieze tijdstip van farmacologische behandeling hangt deels af van de factoren die uit het onderzoek beschreven in bijlages 1-3 komen. [redacted].
[redacted].
Alle pups in het nestje worden gebruikt, aangezien op E18-P0 de sexe lastig is te bepalen.

Aantallen en levenstadia

Aantallen en levenstadia per jaar:

Diersoort	**Muis**	**Muis**	**Muis**	**Muis**
Aantal	168	576	192 + 32 moeders	77
Stam	[redacted] *BL6*	[redacted] *BL6*	*C57BL/6J*	RAG2null *BL6*
Geslacht	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen
Leeftijden (maanden)	[redacted]	[redacted]	E18, 8 tot 20 weken voor moeders	2 m, 4 m

- Drachtige muizen waarvan de pups (beide sexen) op E18 onder terminale anesthesie en hysterectomie worden geboren.
- De genereerde nestjes worden geïnjecteerd met [redacted]
- Per experiment worden de muizen na [redacted] Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- Het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. Wanneer niet alle dieren nodig zijn, worden de resterende dieren verzameld voor biobanking.
- Experimentele variaties kunnen ontstaan doordat [redacted]). Met deze variaties is al rekening gehouden in de bovenstaande berekeningen van aantallen.
-

- Om logistieke redenen is het niet realistisch dat er meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd worden.

Maximaal 1045 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair [redacted] gedaan aan [redacted] [redacted]) van [redacted] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit [redacted] geen belangrijke [redacted]. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met [redacted] van patiënten [redacted]). [redacted] de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

Vermindering:
Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. [redacted]. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

Verfijning:
Er wordt op basis van de resultaten uit bijlage 1 – 3 een model gekozen met milde ziekte kenmerken.
Weliswaar duren de experimenten dan langer voordat effecten kunnen worden waargenomen, maar wordt matig tot ernstig lijden voorkomen.
Daar het verloop van de ziekte ons bekend is wordt tijdig voer op de bodem van de kooi gelegd en worden de experimenten beëindigd op het moment dat we effecten op coupe niveau (histopathologie) mogen verwachten. Door de multidisciplinaire aanpak beschreven in de 4 bijlagen kan een zeer efficiënte fok worden opgezet en worden grote aantallen surplus dieren van niet-gewenste genotypes voorkomen.

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

[redacted] (zoals > 15% gewichtsverlies, [redacted]) zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er wordt samen met de IvD een score tabel opgesteld voor een humaan eindpunt waardoor ernstig ongerief voorkomen kan worden. De genetisch gemodificeerde dieren,

hun controles en het gebruikte beddingmateriaal wordt conform de wet verbrand zodat niets in het milieu terecht kan komen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☐ Nee

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

De mannetjes worden solitair gehuisvest omdat bekend is dat deze vechten bij groepshuisvesting.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het moederdier zal onder terminale anesthesie een hysterectomie ondergaan.
Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk (Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (2008), [redacted] Pups worden na de behandeling bij fostermoeders gelegd. Dat gaat heel goed.

☐ 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?

[redacted].

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

[redacted].

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

Uit de bestaande genetisch gemodificeerde muizen wordt een mild model gekozen en wordt er zacht voer op de bodem van de kooi gelegd. De uitgevoerde behandelingen (intracraniele toediening van cellen) gebeurt onder pijnbestrijding. Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk (Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals (2008), editors: R.E. Fish, M.J. Brown, P.J. Denneman, A.Z. Karas), daarom wordt hypothermie gebruikt door de pups in met ijs gekoelde (klei vervaardigde) mallen te plaatsen. Direct contact met ijs wordt vermeden om bevriezing van de huid te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

[redacted]. Er worden geen complicaties verwacht van farmaca doordat deze zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is dus niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken farmaca ongerief veroorzaken.

Tabel 2: ongerief per handeling

A. handeling	**B. kwalificatie** *terminaal/gering/matig/ernstig*	**C. duur v.h. ongerief**
Uithalen van baarmoeder	terminaal	2 min
[redacted]	Matig (onder anesthesie)	10 min.
i.p. injecties	Matig	30 sec (dagelijks tot wekelijks)
[redacted]	Licht	3x 5 min
[redacted]	Licht	4x 5 min
Doden	Licht (onder anesthesie)	30 sec
Genetisch gemodificeerde homozygote dieren ouder >4 maanden	Matig	2-6 maanden

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.

[redacted]) voor verdere ex-vivo analyse.

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

8.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
Het NVWA nummer is 11400

2. Titel van het project:
[redacted] *in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën*

3. Titel van de NTS:
[redacted] *in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën*

4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC: *26-04-2017*
   - ☐ aanvraag compleet: *26-04-2017*
   - ☐ in vergadering besproken: *09-05-2017 en 13-06-2017*
   - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t*
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *09-05-2017 tot 06-06-2017 en 14-06-2017 tot 20-06-2017*
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
   - ☐ aanpassing aanvraag: *20-06-2017*
   - ☐ advies aan CCD: *17-07-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
-Datum advies IvD: *26-04-2017*
-Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*

8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*

9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1
- Datum: *09-05-2017*
- Strekking gestelde vragen*: De aanvraag moet op een hoger aggregatieniveau worden beschreven, er staan momenteel teveel details in, die vaak niet aan de orde zijn voor het beantwoorden van de gestelde vraag. Het is niet duidelijk wat er nu precies met één dier gebeurd, beschrijf de beoogde handelingen (aard, frequentie, duur) en verklaar de gekozen aanpak. Het wetenschappelijk belang moet beter naar voren komen. Voor de DEC is de strategie en de procesflow*

nog niet helder, punt 3.4. Graag ook Figuur 1 bij 3.4.3 aanpassen. De verschillende ingrepen bij de dieren weergeven in een tabel.
- Datum antwoord: *06-06-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De aanvraag is aangepast op de bovenstaande punten.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De DEC was van mening dat de aanvraag op een volgende DEC vergadering moest terugkomen.*

Vraagronde 2
- Datum: *14-06-2017*
- Strekking gestelde vragen: *Graag ziet de DEC dat hier nog een stuk tekst over het waarom men gebruik wil gaan maken van* [redacted] *wordt toegevoegd. Bij de bijlagen moet onderdeel A duidelijk korter, less is more. Bijlage 4: Voor de DEC is het idee van de* [redacted] *nog niet helder, hoe ga je dit doen? En met welke* [redacted] *En hoe ga je het resultaat meten?*
- Datum antwoord: *20-06-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *Onderzoek in muismodellen heeft laten zien* [redacted]*. Vervanging van de* [redacted] *in patiënten met* [redacted] *biedt dus therapeutische mogelijkheden. Door het gebruik van* [redacted] *wordt* [redacted] *beoogd (zie bijlage 4).*

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): *n.v.t.*

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom: *n.v.t., geen van de DEC leden is betrokken bij dit project.*

C. Beoordeling (inhoud)

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

   Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

Neurodegeneratieve ziekten zijn aandoeningen waarbij de hersenen en/of het zenuwstelsel zijn aangedaan. Een van de ernstigste ziekten op dit gebied bij kinderen is de erfelijke [redacted] waarbij de [redacted] deze ziekte wordt om die reden [redacted]) genoemd. Als in gezonde kinderen en volwassenen de [redacted] van de hersenen beschadigd wordt, wordt de schade door bepaalde cellen [redacted]) gerepareerd; dit herstelmechanisme faalt bij kinderen met [redacted] Hierdoor ontwikkelen deze kinderen o.a motorische coördinatieproblemen, spasticiteit en epilepsie. Veel van deze kinderen sterven op jonge leeftijd. Er is nog geen behandeling voor [redacted] en het ziektemechanisme is nog onvoldoende duidelijk. Wel is duidelijk dat [redacted] bij [redacted] een grote rol spelen en dat alle [redacted] functies bij de ziekte aangedaan zijn.

Het directe doel van deze studie is het ontrafelen welke mechanismen bij [redacted] betrokken zijn, waarom koorts de ziekte zo snel verergert en hoe de beschadigde [redacted] hersteld kan worden. Wanneer er in kaart is gebracht welke [redacted] hierbij belangrijk zijn kan men onderzoeken welke [redacted] behandeld moet worden om de [redacted] afwijkingen bij [redacted] te beïnvloeden. Dit wordt in een proefdiermodel met [redacted] uitgezocht. Ook de invloed van een bepaald [redacted] wordt onderzocht.

Het uiteindelijke doel van de studie is om een [redacted] therapie (een [redacted] behandeling met [redacted]) te ontwikkelen voor patiënten met [redacted]), die de ziekte remt of zelfs geneest.

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten ([redacted]). De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan, symptomen [redacted] [redacted]) vertonen en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor [redacted] bevorderd worden: De fundamentele kennis zal bijdragen aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie om [redacted]) te remmen of te genezen. Hiernaast kan dit onderzoek ook informatie opleveren voor de behandeling van andere neurodegeneratieve ziekten.

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

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe.

   Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden, evenals voldoende deskundigheid en financiering om het project succesvol uit te voeren. Ervaring binnen het onderzoeksinstituut met vergelijkbaar onderzoek waarborgt het technisch succesvol uitvoeren van de dierexperimenten. Bovendien wordt er nauw samengewerkt met de academische wereld en andere instituten actief binnen dit onderzoeksveld.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

   De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder, en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De nieuw verkregen inzichten kunnen bijdragen aan het beschikbaar komen van een nieuwe therapie om [redacted] te remmen of zelfs te genezen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw en de financiële ondersteuning.

   Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: *n.v.t.*

   Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De locatie is binnen de instelling van de vergunninghouder. De dieren krijgen adequate verdoving en pijnbestrijding.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.

    De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.

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

    Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd.

    De dieren zullen maximaal matig ongerief ondervinden. Daar waar een behandeling zal aanslaan, zal het ongerief licht zijn. Van alle dieren zal ongeveer 40% licht ongerief en 60% matig ongerief ondervinden. Licht ongerief ontstaat in dierproef 1 en 4 als gevolg van mobiliteitstesten en het doden van de dieren. Licht ongerief ontstaat in dierproef 2 als gevolg van mobiliteitstesten, het [redacted] bloedafnames, injecties, anesthesie en doden. Licht ongerief ontstaat in dierproef 3 door de

uitname van de hersenen onder anesthesie voor ex-vivo analyses. De moederdieren ondervinden licht ongerief als gevolg van doding. Matig ongerief zal ontstaan als gevolg van injecties (onder anesthesie) en door de symptomen van de [redacted] (licht tot matig, afhankelijk van de duur).

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.

De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren mobiliteitstesten ondergaan, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood. Daarnaast zullen de dieren de symptomen van de [redacted] ontwikkelen, wat leidt tot [redacted] De ontwikkeling van de [redacted] is een noodzakelijk onderdeel van het diermodel dat nodig is voor de proeven.

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.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een scorelijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt: som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies.

De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Het fenotype [redacted] is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Bij het samenstellen van het werkprotocol zal hier gedetailleerd over gecommuniceerd worden met de IVD. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap) en het gewicht wordt gemonitord. De kans dat de dieren een humaan eindpunt bereiken is 10% in dierproef 1 en 4, 20% in dierproef 2 en 1% in dierproef 3. Meer dan matig ongerief wordt voorkomen door het toepassen van de humane eindpunten.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de <u>vervanging</u> van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Er wordt eerst vooronderzoek gedaan in celkweek, er wordt hierbij zoveel mogelijk gebruikt gemaakt van weefsel van overleden patiënten. Echter om de [redacted] en de behandeling hiervan goed te kunnen onderzoeken is een intact lichaam nodig om het [redacted] te kunnen meten. Het onderzoek mag niet in kinderen gebeuren als nog te weinig bekend is of de behandeling zal werken en of die behandeling dan ook veilig is. Daarom worden muizen gebuikt als model.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De muis is het kleinste model waarin de ziekte kan worden nagebootst met dezelfde mutatie in het gen als in de patiënt. Daarnaast komen de ziektekenmerken in de muizen precies overeen met die in de patiënten.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Soms is het nodig eerst een pilot uit te voeren om de haalbaarheid of het beste model te toetsen. De huisvesting en de voeding van de muizen is gestandaardiseerd zodat weinig spreiding in de resultaten van het onderzoek wordt verwacht.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 7902 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd.

Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. Het is bekend op welke leeftijd de dieren motorische problemen kunnen gaan vertonen. Ruim voor die tijd wordt het voer op de bodem van de kooi gelegd en worden lange tuiten op de drinkflessen gezet, zodat de dieren makkelijker kunnen eten en drinken. Meer dan matig ongerief wordt voorkomen door het toepassen van de humane eindpunten.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

In dierproef 1 en 4 zullen dieren van beide geslachten worden gebruikt. In dierproef 2 worden alleen mannelijke dieren gebruikt, omdat men hier de [redacted] gaat meten. Door verschillen in [redacted] is statistische analyse van deze experimenten niet haalbaar als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog brengen. Ook in onderdeel A2 van dierproef 3 worden om dezelfde reden alleen mannelijke dieren gebruikt, bij alle andere

onderdelen gebruikt men beide geslachten.

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

    Na het doden van de dieren zal men de hersenen gebruiken voor verdere ex-vivo analyses. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

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

    NTS

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

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag

    Rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van de dieren?

    Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de mechanismen die bij [redacted]) betrokken zijn en het ontwikkelen van een [redacted] therapie voor kinderen met deze ziekte het gebruik van maximaal 7902 muizen die daarvan licht tot matig ongerief ondervinden?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af.

    De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de proefdieren wordt aangetast en de dieren ondervinden licht tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling over deze wittestofziekte ([redacted] De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van een therapie om [redacted] bij kinderen te verminderen of te genezen. Daarnaast kan dit onderzoek ook informatie opleveren voor de behandeling van andere neurodegeneratieve ziekten.

    De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 7902 muizen, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van meer kennis over [redacted] en de

behandeling hiervan is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is het verkrijgen van meer kennis over de betrokken mechanismen bij de erfelijke [redacted] Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een behandeltherapie is afgewogen tegen het, licht tot matig geschatte ongerief en de aantasting van integriteit, inclusief het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 7902 muizen, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Zowel het maatschappelijk als het wetenschappelijk belang is substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over [redacted] en zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van een behandeling hiervan.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis zal worden verkregen. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 7902 muizen en het daarbij verwachte lichte tot maximaal matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC.

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er is geen dilemma geconstateerd.

Centrale Commissie Dierproeven

9.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted] 20172804
Bijlagen
2

Datum 1 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 juli 2017. Het gaat om uw project "[redacted]: pathogenese en potentiële interventie therapieën". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020172804. 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.

Datum:
1 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
1 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
1 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

Gegevens gemachtigde

Naam:	[redacted]
Postcode en plaats:	[redacted]
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?	Ja

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2018
Geplande einddatum:	1 januari 2023
Titel project:	[redacted]: pathogenese en potentiële interventie therapieën
Titel niet-technische samenvatting:	[redacted]: pathogenese en potentiële interventie therapieën
Naam DEC:	[redacted]
Postadres DEC:	[redacted]
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Datum:
1 augustus 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	13 f functionaris (Proefdierdeskundige)
Plaats:	[redacted]
Datum:	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted] 20172804
Bijlagen
2

Datum 1 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 1 augustus 2017
Vervaldatum: 31 augustus 2017
Factuurnummer: 172804
Ordernummer: inkoopnr. [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag [redacted] 20172804	€ 1.684,00

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

10.

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: donderdag 31 augustus 2017 15:22
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: [redacted] 20172804: aanvullende informatie

Urgentie: Hoog

Categorieën: Dossier: [redacted]

Geachte CCD,

Hierbij wil ik u laten weten dat we de vandaag de aangepaste documenten behorende bij [redacted] 20172804 hebben geüpload.
Het zijn 7 documenten: De antwoorden op de vragen, de aangepaste NTS en de 4 bijlagen dierproeven en het (oude) projectvoorstel.
Hoop u zo voldoende te hebben geïnformeerd, mochten er nog vragen zijn dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,
[redacted]

From: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Subject: AVD1140020172804: aanvullende informatie
Date: 23 August 2017 at 11:55:39 GMT+2
To: [redacted]
Cc: [redacted]

Geachte [redacted],

Op 31 juli 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer [redacted] 20172804. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U geeft aan dat er meerdere mobiliteitstesten zullen worden uitgevoerd. In de verschillende bijlages worden voorbeelden van uit te voeren testen genoemd. Dit moet, in het kader van het bepalen van het ongerief dat de dieren ondergaan, echter ingekaderd worden. U wordt daarom verzocht alle mobiliteitstesten te benoemen en te beschrijven.

-In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.4 wordt geen gebruik gemaakt van anesthesie voor [redacted] in jonge pups. U geeft aan dat het gebruik van anesthesie in dit geval niet mogelijk is. De onderbouwing hiervoor ontbreekt echter. Aangezien het niet toepassen van verdoving alleen mag als dit onverenigbaar is met de proef en/of het toedienen van verdoving traumatischer is dan de dierproef zelf, is onderbouwing noodzakelijk voor de beoordeling. U wordt daarom verzocht dit beter te onderbouwen. U wordt daarnaast verzocht aan te geven of bovenstaande ook van toepassing is voor bijlage 3.4.4.3, omdat daar ook intracraniale injecties in pups worden uitgevoerd. Tot slot geeft u in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.4 onder 'K' aan de intracraniale injecties onder anesthesie wordt uitgevoerd. Dit lijkt gezien bovenstaande niet correct. U wordt verzocht dit aan te passen.

- Mannelijke dieren worden in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.4 individueel gehuisvest vanwege onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting. In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.3 worden ook mannelijke dieren gebruikt. In

die bijlagen wordt echter niet aangegeven dat dieren individueel gehuisvest worden. U wordt verzocht aan te geven of de dieren in deze bijlage ook individueel gehuisvest worden.

- Er zijn een aantal onduidelijkheden wat betreft het ongerief en het benodigd aantal dieren:
>In bijlage 3.4.4.1. is niet helder gemaakt hoeveel dieren matig vs licht vs terminaal ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor bijlage 3.4.4.4.
>Het is niet geheel duidelijk hoeveel dieren in bijlage 3.4.4.4 nodig zijn. In de tabel onder B) en in de tekst bij de statistische overwegingen staat aangegeven hoeveel dieren per jaar gebruikt worden. Bij elkaar opgeteld zijn dit 1045 dieren per jaar. Uiteindelijk wordt voor de gehele bijlage 1045 dieren aangevraagd. Indien het inderdaad 1045 dieren per jaar betreft, zijn 5225 dieren nodig.
U wordt verzocht deze onduidelijkheden te verhelderen, de bijlagen dierproeven en eventueel ook de NTS aan te passen.

- U geeft aan dat in overleg met IvD een scorelijst wordt opgesteld voor de humane eindpunten. U wordt verzocht deze scorelijst ook in de aanvraag op te nemen.

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

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

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 1 augustus 2017 11:28
Aan:[redacted]
CC:[redacted]
Onderwerp: OntvangstBevestiging 2804

Geachte[redacted],

Deze brief ontvangt u ook per post.
Factuur is doorgestuurd naar de door u aangegeven emailadres.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Geachte CCD,

Hierbij een antwoord op uw vragen bij ons project met aanvraagnummer AVD1140020172804.

- U geeft aan dat er meerdere mobiliteitstesten zullen worden uitgevoerd. In de verschillende bijlages worden voorbeelden van uit te voeren testen genoemd. Dit moet, in het kader van het bepalen van het ongerief dat de dieren ondergaan, echter ingekaderd worden. U wordt daarom verzocht alle mobiliteitstesten te benoemen en te beschrijven.

Antwoord: Dit is in de bijlagen aangepast.
Het gaat hier om standaard motorisch testen zoals *grip strength measure* (greepkrachtmeting), balance beam (balans balk), *foot print test* (voet afdruk test) zoals eerder door deze groep beschreven (Dooves et al., 2016). Deze testen worden gebruikt om de mobiliteits- en krachtveranderingen bij deze dieren te kunnen meten. Deze testen geven maximaal licht ongerief en hebben geen nadelige gevolgen voor de dieren.

-In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.4 wordt geen gebruik gemaakt van anesthesie voor [redacted]. U geeft aan dat het gebruik van anesthesie in dit geval niet mogelijk is. De onderbouwing hiervoor ontbreekt echter. Aangezien het niet toepassen van verdoving alleen mag als dit onverenigbaar is met de proef en/of het toedienen van verdoving traumatischer is dan de dierproef zelf, is onderbouwing noodzakelijk voor de beoordeling. U wordt daarom verzocht dit beter te onderbouwen. U wordt daarnaast verzocht aan te geven of bovenstaande ook van toepassing is voor bijlage 3.4.4.3, omdat daar ook intracraniale injecties in pups worden uitgevoerd. Tot slot geeft u in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.4 onder 'K' aan de intracraniale injecties onder anesthesie wordt uitgevoerd. Dit lijkt gezien bovenstaande niet correct. U wordt verzocht dit aan te passen.

Helaas is er verwarring ontstaan. Het gaat hier om het toepassen van [redacted]) als geaccepteerde vervangend methode van [redacted]. Bij oudere dieren wordt anesthesie toegepast. Die is nu aangepast in bijlages 1, 3 en 4.

- Mannelijke dieren worden in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.4 individueel gehuisvest vanwege onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting. In bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.3 worden ook mannelijke dieren gebruikt. In die bijlagen wordt echter niet aangegeven dat dieren individueel gehuisvest worden. U wordt verzocht aan te geven of de dieren in deze bijlage ook individueel gehuisvest worden.

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Indien nodig worden mannelijke muizen solitair gehuisvest om vechten te voorkomen. Dit is nu in alle bijlagen 1-4 vermeld.

- Er zijn een aantal onduidelijkheden wat betreft het ongerief en het benodigd aantal dieren:
>In bijlage 3.4.4.1. is niet helder gemaakt hoeveel dieren matig vs licht vs terminaal ongerief ondergaan. Hetzelfde geldt voor bijlage 3.4.4.4.
>Het is niet geheel duidelijk hoeveel dieren in bijlage 3.4.4.4 nodig zijn. In de tabel onder B) en in de tekst bij de statistische overwegingen staat aangegeven hoeveel dieren per jaar gebruikt worden. Bij elkaar opgeteld zijn dit 1045 dieren per jaar. Uiteindelijk wordt voor de gehele bijlage 1045 dieren aangevraagd. Indien het inderdaad 1045 dieren per jaar betreft, zijn 5225 dieren nodig.
U wordt verzocht deze onduidelijkheden te verhelderen, de bijlagen dierproeven en eventueel ook de NTS aan te passen.

Deze informatie is nu in beide bijlagen en NTS aangepast. Het totale aantal dieren is 12082 muizen.

- U geeft aan dat in overleg met IvD een scorelijst wordt opgesteld voor de humane eindpunten. U wordt verzocht deze scorelijst ook in de aanvraag op te nemen.

HEP is als volgt gedefinieerd: 15% gewichtsverlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies. Is toegevoegd aan alle bijlagen. Bij het aanpassen van de bijlagen op de bovenstaande punten hebben we nog enkele tekstuele fouten verbeterd.

Centrale Commissie Dierproeven

12.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul de titel van het project in.	[redacted]: pathogenese en potentiële interventie therapieën

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.

1. Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
2. Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
3. Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Deze projectaanvraag beschrijft het onderzoek naar [redacted]) **van kinderen**. [redacted] veroorzaken een [redacted]. Deze aanvraag betreft een specifieke [redacted] is één van de vaakst voorkomende leukodystrofieën bij kinderen en één van de ergste. Bij [redacted] wordt al op zeer jonge leeftijd de [redacted] in de hersenen aangetast met neurologische achteruitgang tot gevolg. Patiënten overlijden vaak snel door verlies van functies. Het is een stress-gevoelige ziekte, waarbij fysieke stressoren, vooral koortsende ziekten, leiden tot snelle achteruitgang. In 2001 is vastgesteld dat [redacted] door mutaties [redacted] wordt veroorzaakt[1]. Deze [redacted].

Sinds 2001 onderzoeken wij de **pathofysiologie** van deze fatale ziekte, vooral ook om aangrijpingspunten voor therapie te vinden. [redacted]

[redacted] spelen een essentiële rol in de homeostase van de hersenen. In de [redacted] controleren ze [redacted] De interactie tussen [redacted] en [redacted] is belangrijk voor de [redacted] in de hersenen en voor de integriteit van de [redacted] reageren op [redacted] door middel van een complex proces, zogenaamde [redacted], wat een [redacted] met gunstige en ongunstige aspecten. [redacted] variëren van [redacted] en [redacted] tot [redacted] en [redacted]. Het is aangetoond dat zonder [redacted] groter wordt en [redacted] mislukt.

[redacted] **pathologie** varieert in ernst onder patiënten: van babyleeftijd met overlijden binnen een paar maanden tot kinderleeftijd met overlijden binnen enkele jaren tot in zeldzame gevallen volwassenleeftijd met langer overleven. [redacted] pathologie varieert ook in ernst [redacted] van de hersenen. Niet alleen is er [redacted] in ernst van wittestofschade, maar ook in kans op [redacted].

Als we begrijpen waarom [redacted] *het zoveel beter doen, kunnen we dit misschien in therapie vertalen.*

We hebben aanwijzingen op een stoornis in de [redacted]

Dat de gestoorde [redacted] *bijdraagt aan de* [redacted] *fpathologie in* [redacted] *is zeker; hoe moet nog worden onderzocht.*

Voor verder onderzoek hebben wij **2 muismodellen** ontwikkeld met dezelfde mutaties als in de mens voorkomen. Deze muizen vertonen dezelfde klinische kenmerken en wittestofafwijkingen als patiënten en kunnen daarom gebruikt worden voor verder onderzoek[3]. Met deze muizen zijn recent

sterke aanwijzingen gevonden dat bij [redacted] zijn aangetast[3].

Onderzoek naar het **moleculaire mechanisme** van [redacted] heeft aangetoond dat door de mutaties de activiteit van [redacted] is. [redacted] is essentieel voor de vertaling van mRNA naar eiwit en voor de regulatie van de snelheid van mRNA vertaling en daarmee de eiwitsynthesesnelheid. Met name is [redacted] belangrijk voor het remmen van de [redacted] bij stress, zoals [redacted] Deze reactie heet de "[redacted]). De verlaagde activiteit van [redacted] in [redacted] leidt tot een chronische abnormale activatie van de [redacted] met verhoogd expressie van verschillende [redacted] Als gevolg hiervan treedt een verandering van het [redacted] profiel op.

Wij hebben onderzocht wat het afwijkende [redacted] profiel is in de hersenen van [redacted] patiënten en muizen (ongepubliceerde data). [redacted] geïdentificeerd, die verhoogd of verlaagd tot [redacted] komen in [redacted] vergeleken met wildtype controle muizen. De screen is bevestigd [redacted] een afwijkende [redacted] vertonen. Immunohistochemische analyses op postmortem hersenmateriaal hebben aangetoond dat [redacted] en [redacted] bij patiënten dezelfde afwijkende [redacted] vertonen als de [redacted] muizen. We hebben gevonden dat de eerder gevonden afwijkende [redacted] wordt door [redacted]-[redacted]

Hoe de regulatie precies verloopt, is nog onvoldoende bekend. Wij hebben in hersenen van [redacted] patiënten en [redacted] muizen bevestigd dat de [redacted] [redacted], geactiveerd zijn in [redacted] en [redacted] Een link tussen eIF2B mutaties en gestoorde rijping van [redacted] en [redacted] in [redacted] is nog onvoldoende onderzocht. *Onduidelijk is of de* [redacted] *een (onvoldoende) beschermende of causale rol in het* [redacted] *ziektemechanisme heeft.* Door de [redacted] of de daardoor [redacted] (ook aangeduid als routes) te moduleren kunnen we deze vraag beantwoorden. Deze modulaties kunnen [redacted] bewerkstelligd worden in de [redacted] muismodellen. Om exact te begrijpen hoe de [redacted] het best kan worden gemoduleerd om de ziekte [redacted] te beïnvloeden, wordt het onderzoek op verschillende niveaus uitgevoerd en worden resultaten onderling vergeleken. De resultaten zullen leiden tot inzicht in hoe remming of verbetering van de ziekte bij [redacted] patiënten kan worden bereikt.

Er is geen **behandeling** voor [redacted] en het ziektemechanisme is onvoldoende duidelijk om verder te komen. Wel is duidelijk dat [redacted] een grote rol spelen en dat alle [redacted] functies aangedaan zijn. Daarom focussen we de laatste jaren op ontrafelen van de bijdrage van [redacted] aan ontstaan en progressie van de ziekte *in alle opzichten*. Voor [redacted] is het noodzakelijk dat *alle* functies van [redacted] hersteld worden. Het aanpakken van verschillende [redacted] dysfuncties vereisen verschillende therapieën en *een succesvolle therapie zal derhalve* [redacted] *zijn,* net als bij andere [redacted] Vanwege de ernst van de ziekte en het overwegend voorkomen op de jonge kinderleeftijd en ontbreken van overlevingskansen is het cruciaal om onderzoek naar multimodale therapie nu uit te voeren. Onderzoek aan het ziektemechanisme en potentiële behandelstrategieën voor [redacted] vormen het doel van het beschreven werk, in vervolg op bovenbeschreven eerder gevonden resultaten. Dit onderzoek is uitgesplitst in verschillende deelonderzoeken, die elk met elkaar samenhangen en waar resultaten voortdurend worden vergeleken met resultaten uit patiëntmateriaal. Op basis van die gegevens wordt het plan bijgesteld. Dit wordt duidelijk gemaakt in de flowchart, besproken bij 3.4.3.

Het gehele onderzoek wordt vanuit de volgende 4 disciplines uitgevoerd in muismodellen: (1) in vivo, (2) ex vivo moleculair biologisch, (3) biochemisch, en (4) histopathologisch zonder en met interventies. Op deze manier kunnen snel gegevens binnen een multidisciplinair team worden verkregen en vergeleken met het huidige of nieuw patiëntmateriaal. De interventies bestaan uit het toedienen van [redacted]. Deze interventies worden hierna verder

uitgelegd. Voor deze multidisciplinaire aanpak is een grote subsidie aangevraagd, waarin al deze aspecten zijn benoemd. Einddoel is het ontwikkelen van multimodale therapie voor [redacted] gebaseerd op de verworven kennis.

Referenties:

[redacted]

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het hoofddoel is te komen tot een [redacted] voor patiënten met [redacted]
Daarvoor gaan we ons de komende jaren richten op onderzoek van de pathologie, inclusief de impact van specifieke interventies, en de achterliggende mechanismen van de [redacted]. Hiervoor zullen we materiaal gebruiken zowel geïsoleerd uit hersenen van overleden patiënten als uit muismodellen (normaal en [redacted] waarin de ziekte is gemoduleerd. Het doel is alle mogelijke aangrijpingspunten voor therapie van [redacted] te exploreren en op grond van de resultaten te komen tot [redacted] therapie voor patiënten.
Deze projectaanvraag is onderverdeeld in vier sub-vragen, die onderling verband houden met elkaar en bij 3.4 verder worden uitgelegd en onderbouwd.

Bijlage 1: Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] gericht op o.a verbeterde [redacted] functie.
M.a.w. vormen [redacted] het enige celtype of zijn er nog andere celtypen waarop gentherapie gericht moet worden om verbetering te bereiken?

Bijlage 2: Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] moleculaire routes
M.a.w. zijn verminderde [redacted] activiteit en [redacted] als enige routes verantwoordelijk voor het [redacted] van de [redacted]?

Bijlage 3: Verbetering van [redacted] functie ex-vivo na isolatie van [redacted] uit muizen met [redacted]
M.a.w. welke (slechte) functies van [redacted] moeten geremd worden en welke (goede) functies moeten worden versterkt ten gunste van [redacted]

Bijlage 4: behandeling van [redacted] in muizen met [redacted])
M.a.w. kan [redacted] de beschadigde [redacted] bij [redacted] herstellen en is het resultaat beter met [redacted] therapie die geoptimaliseerd is in bijlage 1 - 3?

Daar alle onderzoeksvragen uit bijlagen 1 – 4 grotendeels parallel zullen worden uitgevoerd, waarbij tussentijds strategische besprekingen zullen zijn om go no-go's per bijlage te bespreken (keuze vervolgstap/diermodel/interventie) is een traject van 5 jaar haalbaar om naar een eerste aanzet voor een [redacted] aanpak van [redacted] te komen. Er is funding om het onderzoek te kunnen uitvoeren.
De onderzoekers hebben jarenlange ervaring op dit gebied. Er is veel samenwerking tussen de

onderzoekers en de kliniek. De technische expertise om de experimenten (zowel in vivo als ex-vivo) is al aanwezig.
Gezien het voorwerk, de preliminaire data, het aantal mensen in de onderzoeksgroep en de expertise van de onderzoeksgroep met toonaangevende publicaties is het project zeer haalbaar. Het onderzoek hangt niet van het succes van 1 specifiek experiment af.

3.3 Belang

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

[redacted] is één van de vaakst voorkomende en één van de ernstigste genetische ziekten van de [redacted] van de hersenen (zogenaamde "[redacted] bij kinderen. [redacted] komen bij tenminste 1:7,500 kinderen voor, waarschijnlijk vaker. [redacted] is klinisch gekarakteriseerd door progressieve motorische problemen en verlies van ook andere neurologische functies door progressief verdwijnen van de [redacted]. De beginleeftijd en ernst van [redacted] varieert en is afhankelijke van het de precieze mutatie (genotype). De ernstigste vorm van [redacted] ontstaat al intra-uterien; de pasgeborenen hebben een ernstige [redacted]; zij sterven binnen enkele maanden. Bij de meeste kinderen met [redacted] ontstaat de ziekte tussen 1 en 6 jaar en volgt overlijden na enkele jaren. Latere vormen van [redacted] met ontstaan na de 6 jaar zijn veel zeldzamer; dan verloopt de ziekte langzamer en leidt de ziekte tot een langzaam progressieve encefalopathie en sterven na enkele tot enkele tientallen jaren. Voor [redacted] is geen behandeling beschikbaar. Het is daarom belangrijk de pathogenese van deze ziekte beter te begrijpen om daarmee aangrijpingspunten voor interventie strategieën te vinden. Hopelijk geven de gegevens die verkregen worden uit het hier beschreven onderzoek aanwijzingen voor behandeling van deze ziekte, zodat ernstige invaliditeit en (vaak zeer) vroege mortaliteit voorkomen kan worden.

Wetenschappelijk belang

Wetenschappelijk is het belangrijk dat het ziektemechanisme wordt opgehelderd (de rol van [redacted]) en gepubliceerd, zodat deze informatie voor alle relevante wetenschappers beschikbaar is. De aanpak die wij voor ogen hebben kan mogelijk ook informatie opleveren voor onderzoekers die aan andere [redacted]. [redacted].

Maatschappelijk belang

Maatschappelijk is het belangrijk dat op basis van de wetenschappelijke gegevens onderzoek kan worden uitgevoerd naar de preventie en behandeling van deze ernstige ziekte, die veel leed en ook zeer hoge kosten met zich meebrengt. Daar het lijden van de patiënt ernstig en uitzichtloos is en het vaak (zeer) jonge kinderen betreft, is het leed voor de familie zeer groot. Momenteel is er geen therapie, alleen ondersteunende behandeling om het lijden te verlichten. Om een snelle voortgang van het onderzoek te garanderen is het belangrijk dat de voorbereidende stappen beschreven in de verschillende addenda apart van elkaar maar parallel kunnen worden uitgevoerd.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het primaire doel is een begin te maken van het ontwikkelen van [redacted] therapie voor [redacted] Hiervoor is een verdere opheldering van het ziektemechanisme onderliggend aan [redacted] en inzicht in het [redacted] noodzakelijk. Het onderzoek zal deels met patiëntmateriaal worden uitgevoerd en deels met materiaal uit genetisch gemodificeerde muizen, die dezelfde klinische verschijnselen en moleculaire en histopathologische afwijkingen vertonen als [redacted] patiënten, met wild-type dieren als controle.

Het onderzoek is verdeeld in de volgende research onderdelen:

1. [redacted] therapie
Gebaseerd op literatuur gegevens dat gentherapie bij andere [redacted] verbetering laten zien in de patiënt en de [redacted] veilig worden geacht voor de patiënt; op welk celtype deze therapie bij [redacted] gericht moet worden staat nog niet vast (alleen [redacted]?).

2. [redacted] therapie
- zoals met [redacted] beïnvloeden;
- om het [redacted] te maken.

3. [redacted] therapie om zieke [redacted] en [redacted] te vervangen en weefselschade te herstellen.

4. De combinatie van 1.-3. Is de basis van de [redacted] therapie:
Er zijn toenemende aanwijzingen dat [redacted] aanpak bij [redacted] beter effect heeft[6]. Sinds 2009 werken wij aan de ontwikkeling van [redacted] en [redacted] therapie. Daarbij kunnen nieuwe inzichten in het ziektemechanisme leiden tot nieuwe therapie strategieën.

[redacted] was tot nog toe een onbehandelbare ziekte, waar de uitkomst van vaststond: toenemende handicap en overlijden. Met meer inzicht komt therapie voor [redacted] dichter bij. Uit onderzoek aan andere [redacted] blijkt dat een combinatie therapie het meest succesvol is[6]. Wij beogen derhalve de ontwikkeling van een [redacted] therapie waarbij [redacted] op verschillende [redacted] wordt aangepakt: de activiteit van [redacted] of daaraan gerelateerde [redacted] routes, de [redacted] in het DNA, de [redacted].
De beste benadering voor [redacted] lijkt dat de patiënt eerst wordt voorbereid met farmaca waarvan bekend is dat zij deels verbetering geven op verschillende niveaus, zoals verhoging van de [redacted] activiteit in [redacted] en verlaging van de [redacted]. Met [redacted] kunnen cellen waar de [redacted] op gericht is, genezen worden. Met [redacted] wordt herstel van de [redacted] beoogd. Als de [redacted] omlaag gebracht is, kunnen [redacted] (zie b) en als gevolg daarvan de [redacted] de beste kans van slagen. We voorzien derhalve dat een effectieve en veilige behandeling bestaat uit [redacted] nodig zal zijn voor de behandeling [redacted] Met dit project hopen we dat we voldoende gegevens verkrijgen om een antwoord op de therapievraag te geven.

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

De gegevens die wij tot nu toe hebben verkregen uit zowel patiënt als muis zijn de basis voor het huidige onderzoek.
De muismodellen die wij hebben ontwikkeld geven een representatief beeld van de menselijke ziekte [redacted] De twee [redacted] modellen [redacted]) hebben mutaties waarvan bekend is dat beide mutaties bij [redacted] patiënten onafhankelijk van elkaar een ernstig ziektebeeld veroorzaken. In de twee muismodellen zijn vergelijkbare klinische en histopathologische verschijnselen waargenomen als wij bij patiënten hebben gezien:

- heterozygote-homozygote [redacted]) muizen;
- en de dubbel homozygote ([redacted]) muis.

Hiervan is de [redacted] het mildste model, en de [redacted] het ernstigste model.

Bijlage 1 [redacted] therapie: beschrijft de onderzoeksvraag of [redacted] een [redacted] ziekte is en de ziekte alleen gedreven wordt door de [redacted]. Het moet duidelijk worden of er een 'by-pass' mechanisme is waardoor [redacted].
Dit is met name een celbiologische aanpak.

Bijlage 2 [redacted] **therapie (in vivo):** beschrijft de [redacted] routes van [redacted] en richt zich op de rol van [redacted]. Welke afwijkende [redacted] speelt daarbij een rol en kan het moduleren van [redacted] het ziekteproces beïnvloeden?
De nieuwe muismodellen (o.a. door kruisingen van de [redacted] met specifieke knockout muizen stammen) worden gedegen in kaart gebracht. Daarnaast zullen [redacted] toegepast worden, die specifiek aangrijpen op een onderdeel van [redacted] waarna het effect in het model bestudeerd kan worden.
Hier vinden interventies ('behandelingen') plaats, en worden naast de ex-vivo analysis van moleculair –biologische en histologische parameters ook klinische relevante parameters beoordeeld op het gebied van motoriek [redacted].

Bijlage 3 [redacted] **therapie (ex vivo):** beschrijft met *ex-vivo* materiaal (mens en muis) m.b.v. cel- en weefselkweek en eiwit analyses hoe de [redacted] en het noodzakelijke herstel daarvan bepalen. We willen duidelijk krijgen waarom en hoe het herstelmechanisme van de [redacted] faalt.

Bijlage 4 [redacted]**:** beschrijft het effect met [redacted] op [redacted] muizen, geïsoleerd gevolgd door verschillende [redacted] routes met stoffen, die uit eerder onderzoek of uit resultaten van bijlage 1 – 3 geselecteerd zijn. Hier wordt dus de optimale [redacted] therapie gezocht.

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het onderzoek naar de pathogenese en het onderzoek naar de mogelijke behandeling van patiënten met [redacted] hangen nauw met elkaar samen. De behandeling streeft er immers naar om op cel niveau het falen van de [redacted] in verschillende taken te kunnen herstellen. Er is daarom bewust gekozen om enerzijds door moleculair-biologisch en eitwit onderzoek de betrokken route(s) te onderzoeken en door cellulair-pathologisch onderzoek het cellulaire mechanisme te doorgronden en anderzijds daar waar meer inzicht verkregen wordt in een moleculair of cellulair mechanisme dat te repareren door [redacted].
Deze benadering is bewust verdeeld in de expertises van betrokken onderzoekers (pathologisch / celbiologisch, moleculair biologisch en stam celbiologisch). Het gehele onderzoek valt onder de supervisie van de hoogleraar die [redacted] ook het patiënten onderzoek leidt. In deze multidisciplinaire groep van onderzoekers worden de resultaten gezamenlijk besproken en worden vervolgstappen in het onderzoek vastgesteld. Per bijlage worden deze specifieke mijlpalen en keuzemomenten besproken, zodat per bijlage 1 – 3 alleen de optimale interventie uiteindelijk in [redacted] in bijlage 4 zal worden onderzocht. .

Het onderzoek wordt breed opgezet door parallel histopathologisch, moleculair biologisch, celbiologisch en preklinisch (in muizen modellen) onderzoek te verrichten en de gegevens continue met elkaar te vergelijken. Indien in een van de onderzoekslijnen (lees dierproef beschreven in de bijlagen) resultaat gevonden wordt, wordt dit direct besproken met alle onderzoekers en wordt indien nodig het onderzoek aangepast. Daar waar gegevens leiden tot een 'dood spoor', wordt het gerelateerde onderzoek in de andere onderzoekslijn stopgezet.
Eén en ander moet duidelijk worden uit de flowchart bij 3.4.3. met de 'go-no go momenten' erin opgenomen welke per bijlage staan vermeld.

[redacted]

Figuur 1: Flowchart voor [redacted] via afzonderlijke benaderingen.
De flowchart brengt de strategie in beeld om met gegevens vanuit de patiëntjes, welke input geven om de ziekte eerst via aparte benaderingen (cellulair, moleculair biologisch en genetisch) specifiek te onderzoeken. De onderzoeksstrategieën in bijlages 1,2,3 en 4 zullen simultaan starten. Binnen iedere bijlage zijn er GO en NO-GO stappen. Daarnaast zullen onderzoeksresultaten binnen iedere bijlage geprojecteerd worden op de andere bijlages (blauwe pijlen). Alle verkregen resultaten zullen convergeren in bijlage 4. Alleen die benaderingen welke verbetering geven, zullen doorgaan voor het onderzoek met [redacted]. Hiermee willen vinden welke aangrijpingspunten helpen om de ziekte [redacted] te verbeteren. Met een [redacted] moeten de afzonderlijke benaderingen elkaar versterken en hopen we uiteindelijk de ziekte tot stilstand te kunnen brengen of te genezen.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] **therapie** gericht op o.a verbeterde astrocytaire functie.
2	Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] **interventie**
3	Verbetering van [redacted] functie door **celbiologisch interventie**: ex-vivo analyses na isolatie van o.a [redacted].
4	Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] **therapie** van [redacted], [redacted].
5	
6	
7	
8	
9	
10	

13.

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.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] gericht op o.a verbeterde [redacted] functie.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De huidige gegevens wijzen erop dat [redacted] een [redacted] ziekte is. Een alternatieve hypothese is dat [redacted] wordt veroorzaakt door een simultaan effect door een mutatie [redacted] Deze vraag of [redacted] een [redacted] ziekte is kan worden beantwoord door onderzoek (*ex-vivo)* op de hersenen van verschillende mutante muizen stammen.

1. **Door kruising van conditionele [redacted] muizen aan [redacted] lijnen, wordt onderzocht of selectieve expressie van mutant [redacted] is om [redacted] ziekte te veroorzaken**
   Een nieuwe [redacted] knock-in muizenstam, waarbij de mutatie door kruising selectief in verschillende celtypes tot expressie gebracht kan worden, wordt momenteel met [redacted] techniek elders gemaakt. De specifieke rol van [redacted] zal onderzocht worden door de conditionele [redacted]-in te kruisen met muizenstammen die [redacted] in [redacted] tot expressie brengen.
2. **Met behulp van *in vivo* lentivirale transductie, wordt onderzocht of genetische correctie in een specifieke neurale celpopulatie de ziekte voorkomen kan worden.**
   Gebruikmakend van de beschikbare [redacted] muizen modellen (als eerste keus het [redacted] mutante model [verder te nomen [redacted]] met mild ongerief) zullen wij het genetische defect selectief corrigeren door [redacted] Deze benadering is gebaseerd op het feit dat in recessieve ziekten zoals [redacted] de introductie van één normale kopie van het gemuteerde gen al voldoende is de ziekte te genezen omdat heterozygote carriers geen ziektebeeld hebben. Om de resultaten van deze gen-correctie te bestuderen zullen we [redacted] gebruiken die het wild type [redacted] gen tot expressie brengen van een promoter waarvan bekend is dat tot expressie komt in [redacted] celtypes. We verwachten dat correctie

in [redacted] het beste herstel geeft. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat ook andere kruisingen [redacted] mutatie in specifieke celpopulatie) een phenotype geven, wordt er gekozen voor gencorrectie in [redacted] en in alle [redacted].
De [redacted] zullen een [redacted] label reporter [redacted]-[redacted] Dit zal het monitoren van de transductie efficiëntie en de *in-vivo* aanwezigheid en expressie faciliteren. [redacted] vectoren met alleen het [redacted] reporter gen zullen als controle worden gebruikt. Deze gencorrectie zal direct na de geboorte en lang voor de start van de pathologie worden uitgevoerd in [redacted] muizen.

In alle muizen zal het volgende worden onderzocht:

a. klinisch fenotype ([redacted]);
b. ex-vivo [redacted];
c. ex-vivo [redacted]

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.

A. Intracraniale (i.c.) injectie met [redacted] op dag 0: pups worden na spontane partus van het moederdier gebruikt.

Er is gekozen voor i.c. injectie op P0-1 omdat de behandeling vroeg in de ontwikkeling gedaan moet worden en op deze leeftijd de toediening snel uitgevoerd kan worden. [redacted]

Tabel 1: overzicht handelingen

A. Soort ongerief	B. Frequentie	C. Duur v.h. ongerief
Intracraniale injectie	eenmalig	10 min.
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
Doden	1 maal	1 min
[redacted] fenotype		2-7 maanden

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

Het volgende go-no-go schema wordt aangehouden:

Vraag	Stap		Aantal dieren	go / no go
1	a	In vivo analyse van [redacted] in specifieke [redacted] celtypes op ~5 maanden	max. 30	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende glia maturatie in brein: go naar Stap b
	b	In vivo analyse van [redacted] mutatie in specifieke [redacted] celtypes op ~2 maanden en max. 12 maanden leeftijd	max. 130	

2	a	In vivo analyse van [redacted] in specifieke [redacted] celtypes op ~5 maanden leeftijd	max. 144	Wanneer aanwezig van klinisch phenotype en / of afwijkende glia maturatie in brein: go naar Stap b
	b	In vivo analyse [redacted] gencorrectie in specifieke [redacted] celtypes op ~2 maanden en max. 12 maanden leeftijd	max. 288	

Vraag 1:

Stap a:

- [redacted] muizen worden gekruist aan 4 cre-lijnen (cre-expressie in alle [redacted], [redacted] specifieke cellen), of als controle niet gekruist. Alle dieren worden in eerste instantie op 1 leeftijd geanalyseerd: ~5 maanden (de leeftijd van vroege klinische symptomen).
- Analyses worden uitgevoerd op vers (snap-frozen) en gefixeerd (4% PFA intracraniale perfusies) weefsel
- Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:
  Controle (saline): gemiddelde gevonden waarde 0.86 (aantal nestin-positieve cellen)
  Gewenst effect na behandelding: ≤ 6.32; st.dev.: 2.2 en desired power: 0.8
  ⇨ >3 dieren per groep
  Aantal dieren: 5 lijnen (4 kruisingen + 1 controle) x 1 leeftijd (~5 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 30 dieren
- Alleen de dieren die een fenotype vertonen worden gebruikt in verdere analyses ('go'); andere dieren worden uit de studie gehaald ('no-go').

Stap b:

- Wanneer de dieren in Stap 1 een fenotype vertonen, zullen deze kruisingen ook in Stap 2 worden geanalyseerd: meer verschillende leeftijden.
- Conditionele [redacted] mutanten worden geanalyseerd op ~2 maanden (pre-symptomatisch), ~5 maanden (vroege klinische symptomen; in Stap 1), tot aan het humaan eindpunt (~ 7-12 maanden, sterke klinische symptomen) of eerder als er significante verbetering is gezien in de behandelde groep(en).
- Gebaseerd op eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:
  Control (saline): gemiddelde gevonden waarde 2.08 (grip strength test), gewenst effect na behandelding: ≤ 1.87, St. dev.: 0.16 en desired power: 0.8
  ⇨ >10 dieren per groep
  Aantal dieren voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 2 (1 kruising = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 40 dieren
- Om de ~2 maanden dieren te verzamelen. Gebaseerd op een eerdere studie is de volgende Poweranalyse uitgevoerd: Controle (saline): gemiddelde gevonden waarde 0.86 (aantal nestin-positieve cellen)
  Gewenst effect na behandelding: ≤ 6.32; St. dev.: 2.2 en desired power: 0.8
  ⇨ 3 dieren per groep
  Aantal dieren voor pre-symptomatisch analyse: 2 (1 kruising + 1 controle) x 1 leeftijden (~2 maand) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 12 dieren
- Zullen er meer leeftijden van verschillende kruisingen worden geanalyseerd, hoeft er geen nieuwe controle groep worden meegenomen. Dus voor 4 kruisingen voor pre-symptomatisch analyse: 5 (4 kruisingen + 1 controle) x 1 leeftijden (~2 maand) x 2 fixaties (vers, PFA) x 3 dieren per groep (poweranalyse) = 30 dieren. En voor 4 kruisingen voor gedrag studies + sterke symptomatische analyse: 5 (4 kruisingen = 1 controle) x 1 leeftijd (humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 10 dieren per groep = 100 dieren
- Maximaal aantal muizen: 52 – 130

Vraag 2:

Stap a:

[redacted] met [redacted] die specifieke [redacted] targeten, dmv intracraniale

injecties. Als controle wordt [redacted] gebruikt. Wanneer uit vraag 1 blijkt dat meer dan 1 kruising [redacted] in specifieke celpopulatie) een phenotype geeft, wordt er gekozen voor gencorrectie op maximaal 2 celtypes (= 2 genconstructen).

- Poweranalyse: Gebaseerd op eerdere studies [redacted]) die hebben gekeken naar verbeterd fenotype van muizen met een [redacted] na behandeling met intracraniale injecties, is een poweranalyse uitgevoerd en berekend dat per conditie 4 nestjes nodig zijn: Controle (saline): gemiddelde overleving is 135 dagen, behandeld is de gemiddelde overleving is 171 dagen. St.dev.: 40, desired power: 0.8
  - 20 dieren per groep. Per nest worden 5 tot 6 dieren geboren; dus 4 nestjes (20 dieren) per groep per leeftijd. Indien er meer dieren worden geboren, worden die wel gebruikt in het experiment, dus wordt verder met 24 dieren gerekend
- Maximaal aantal dieren: 3 injecties (2 genconstructen, [redacted] x 1 leeftijd (~5 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 120 - 144 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met [redacted] wordt getest, zal dit 80 – 96 dieren zijn.

Stap b:

- Wanneer dieren op ~5 maanden (Stap 1) een verbeterd fenotype vertonen, zullen meerdere leeftijden worden bekeken tot maximaal het humane eindpunt.
- Aantal dieren: 3 injecties (genconstruct, [redacted] x 2 leeftijden (~2 maanden, max humaan eindpunt) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 - 24 dieren per groep (poweranalyse) = 240 - 288 dieren. Wanneer maar 1 genconstruct (met [redacted] wordt getest, zal dit 160 – 192 dieren zijn.

B. De dieren

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

Muis, mus musculus en genetisch gemodificeerde muizen.
[redacted] conditionele [redacted] muizenstam
Muislijnen die [redacted] cellen tot expressie brengen

Alle dieren zijn afkomstig van erkende fokkers EU/USA of eigen fok.
Maximaal **592** dieren.

Levenstadia: pups (beide sexen) welke spontaan worden geboren en welke op dag 0 of 1 worden behandeld.
Dieren vanaf ca 8 weken tot leeftijd ca 2 maanden (=zonder klinische symptomen), ~5 maanden (= de leeftijd waarop de eerste klinische symptomen zichtbaar zijn als 'wiebelig loopje'); en ~7- 12 maanden

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 is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan lymfoblasten (gekweekte wittebloedcellen) van [redacted] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect.

Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met fibroblasten van patiënten (gekweekte huidcellen). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. [redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van [redacted] is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast kunnen wij niet vrijelijk therapeutica uitproberen bij levende patiënten. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (mn. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

Vermindering:
Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Van het uitgenomen materiaal (breintjes) wordt alles gebruikt voor verdere ex-vivo analyse. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

Verfijning
Zodra blijkt dat na interventie significante fenotypische veranderingen worden waargenomen, zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar 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.

Het neurologisch fenotype van muizen met [redacted] uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren gemakkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Indien nodig worden mannelijke muizen solitair gehuisvest om onderling vechten te voorkomen.

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.

De intracraniele injectie wordt onder hypothermie uitgevoerd. Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk [redacted])), maar indien er nieuwe methodes / inzichten beschikbaar zijn zullen de intracraniele injecties onder anesthesie en adequate perioperatieve pijnbestrijding worden uitgevoerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het wegnemen van de pups voor de intracraniele behandeling gebeurt een voor een.
Kenmerken van [redacted] in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water); gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof van de hersenen.

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

Maximaal dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren.
Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.
In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De criteria voor de humane eindpunten zijn als volgt gedefinieerd: 15% gewicht verlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische

symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

Tabel 2: ongerief per handeling

A. handeling:	**B. kwalificatie** *terminaal/licht/matig/ernstig*	**C. duur v.h. ongerief**
Intracraniale injectie pups	Matig (onder hypothermie)	10 min.
[redacted]	Licht	3x 5 min
[redacted]	Licht	4x 5 min
Doden (Cervicale dislocatie of terminale anesthesie, uitname organen)	Licht of terminaal	Eenmalig, max 1 min.
[redacted] fenotype	Max. Matig	2-7 maanden

Het cumulatief ongerief is 'matig' voor 100% van de 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 breintjes moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyses, een deel van de pups wordt onder anesthesie geperfundeerd om de breintjes geschikt te maken voor immunohistochemie.

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

14.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in	[redacted]
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie	[redacted]
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	

Volgnumme	Type dierproef
2	Behandeling van [redacted] in muizen door modulatie van [redacted] routes

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Gebaseerd op uitkomsten van eerdere experimenten in onze groep zal verder onderzocht worden wat de moleculaire mechanismen zijn achter de ziekte [redacted] Hierbij hopen we de effecten van selectieve mutaties van het enzym [redacted] op te helderen, en nieuwe aanwijzingen te vinden voor therapie in patiënten. De experimentele set-up gaat hierbij dieper in op de mechanismen en de invloed van [redacted] routes op [redacted]
De primaire uitkomst parameters zijn:

- In-vivo: [redacted]
- Ex-vivo [redacted],
- Ex-vivo: [redacted]

Hoofdvraag: hoe leiden mutaties van het enzym [redacted] tot het disfunctioneren van [redacted]-[redacted] en klinische verschijnselen in muizen met [redacted] (hierna aangegeven als "ziekte".
Aanpak: door [redacted] routes die door [redacted] gereguleerd worden te veranderen en vervolgens de effecten op klinische ziekte verschijnselen en de hersenpathologie te onderzoeken.

We weten dat één van de door [redacted] beschreven in de projectbeschrijving, actiever is in [redacted] en [redacted] van muizen en mensen met [redacted] dan in controles. Op dit moment weten we echter niet of veranderde [redacted] en aanverwante [redacted] oorzakelijk bijdrage aan "ziekte" of dat ze juist beschermend werken maar tekort schieten met [redacted] als gevolg. Wij weten nog niet welke onderdelen van de door [redacted] gereguleerde routes belangrijk zijn in [redacted] en hoe (gunstig of ongunstig). Daarnaast kunnen

andere routes ook aan [redacted] "ziekte" bijdragen of beschermen tegen "ziekte". **Voor het ontwikkelen van [redacted] therapie is het belangrijk om beter begrip te hebben van het mechanisme hoe mutaties van [redacted] en hoe veranderingen in door [redacted] routes bijdragen aan [redacted]**
Op dit moment wordt experiment 1 in deze bijlage al uitgevoerd gebaseerd op een DEC project [redacted]
N.B. Dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 i.v.m. de fok van voldoende dieren voor experimenten. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een (tijdrovend) amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

In experiment 1 worden de [redacted] en [redacted] eerst gemoduleerd met een farmacon [redacted]
In vervolgexperimenten willen we de bijdrage van [redacted] routes verder uitzoeken door een [redacted] interventie (door gebruik te maken van [redacted] muizenstammen, beschreven in 2A) en [redacted] modulatie (beschreven in 2B). Ook kan de bijdrage verder onderzocht worden met een aangepast [redacted] in andere concentraties worden toegediend (beschreven in 2C). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [redacted].
Op basis van de uitkomst uit experiment 1 zijn de vervolgexperimenten beschreven in 2A, 2B en 2C waarbij de GO/NO-GO gekozen worden op de basis van gegevens uit de experimenten: moet voor herstel van het fenotype de [redacted]. Als een gekozen aanpak niet werkt, zal deze aanpak niet verder onderzocht worden in deze bijlage noch andere bijlagen van het projectvoorstel.

Resultaten welke verwacht kunnen worden uit experiment 1
resultaat 1A: 20% remming van de [redacted]) en ziekte parameters (>50% verbetering op mobiliteitstesten) in de [redacted] muismodellen nemen af of blijven gelijk.
Interpretatie: De e[redacted] route causaal bijdraagt aan de klinische verschijnselen, histologische en moleculaire afwijkingen in de [redacted] muismodellen (tezamen aangeduid als "ziekte"). Indien er alleen remming van de [redacted] gevonden wordt, zonder verbetering in mobiliteitstesten blijkt dat [redacted] activatie feitelijk beschermt tegen de ziekte maar mogelijk onvoldoende en dat [redacted] deze bescherming overneemt.

Vervolg na resultaat 1A: bijdrage van [redacted] aan de ziekte verder ontrafelen met een [redacted] interventie (door gebruik te maken van genetisch gemodificeerde muizen, beschreven in 2A) en moduleren met een [redacted] aanpak (beschreven in 2B). De selectie van specifieke interventies zal bepaald worden door het effect van [redacted] op de ziekte parameters. Specifiek kan verder onderzocht worden of de ziekteverschijnselen verminderen met een [redacted] aanpak, die gebaseerd is op aanpassing (verlaging) van [redacted] (beschreven in 2C) of de ziekteverschijnselen verbeteren.
Indien beide parameters [redacted]) is dat een NO-GO voor experiment 2C. Doordat resultaat 1A een duidelijk effect heeft op de [redacted] kunnen we in bij experiment 2A het aantal kruisingen beperken en worden 240 dieren bespaard.

Resultaat 1B: [redacted] beïnvloedt de [redacted] activiteit niet significant [redacted] en deze activiteit is onvoldoende om de ziekte parameters te veranderen in de [redacted] Het experiment levert geen bruikbare resultaten op die aantonen of de routes de ziekte veroorzaken of beschermend werken tegen ziekte.
Vervolg na resultaat 1B: In geval van resultaat 1B worden de [redacted] verder onderzocht door een [redacted] interventie met behulp van [redacted] knock-out muizen stammen (beschreven bij experimentele opzet 2A) gecombineerd met een [redacted] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2B) of [redacted] interventie (beschreven bij experimentele opzet 2C).

Resultaat 1C. [redacted] vermindert de ziekte parameters wel significant. Onduidelijk blijft of [redacted] bij resultaat IV een gunstig effect had op de ziekte via [redacted] (on-target of specifiek effect) of via een nog onbekende target (off-target of aspecifiek effect). Deze onduidelijkheid zal dan worden onderzocht op patiënten materiaal of materiaal verkregen met experiment 1.
Vervolg na resultaat 1C: In geval van uitkomst 1C worden de nieuw [redacted]

moduleren verder onderzocht op basis van dan beschikbare gegevens uit literatuur. Indien mogelijk kiezen we voor een [redacted] interventie zoals beschreven bij 2A, 2B en 2C. De interventie is er op gericht om de nieuw ontdekte functie/route zodanig te moduleren dat de ziekteverbetering geobserveerd bij [redacted] toediening bevestigd wordt en verder ontrafeld wordt.

Resultaat vragen 2A, 2B, 2C: Uit de vervolgresultaten gegenereerd in experimenten 2A, 2B en/of 2C wordt een geschikte moleculaire target voor [redacted] geïdentificeerd in de muismodellen. In dat geval willen we een laatste proef uitvoeren die sensitief de genexpressie meet in selectief die cellen die verantwoordelijk voor ziekte zijn zoals bepaald in bijlage 1 (cel-autonomie) en waarbij het verantwoordelijke gen niet langer aanwezig is (bepaald in aanpak 2A). Deze proefopzet is beschreven bij vraag **3**. We kunnen met dit experiment bevestigen of eerder vastgestelde afwijkingen in genexpressie cel-specifiek worden bevestigd en gecorreleerd kunnen worden aan ziekte parameters.

Vraag 3: Wat gaat er cel-specifiek mis als gevolg van de [redacted] mutatie op het niveau van [redacted] en [redacted] en functies? Dit wordt onderzocht in een muismodel waarin de [redacted]). Deze [redacted] label staat toe dat we [redacted]. Uit dit experiment blijkt wat er cel-specifiek mis gaat als gevolg van de [redacted] mutatie op het niveau van [redacted] en functies. Door deze proef komen alle gegevens samen en beantwoorden we de onderzoekvraag concreet (hoe mutaties in [redacted] leiden tot het disfunctioneren van [redacted] muizen).

Het resultaat van 2A, 2B, 2C en 3 samen zal tot identificatie van een moleculair therapeutische interventie leiden die geschikt is voor verdere ontwikkeling voor de humane patiënt.

Uitkomst parameters voor alle vragen (1, 2A-C en 3) in detail met in bold de primaire uitkomst parameters:
In vivo en ex vivo zal onderzocht worden of mutant [redacted] een aangrijpingspunt is van o.a. [redacted] Onderzocht zal worden of de gemoduleerde [redacted] activiteit en [redacted] routes de onderstaande parameters beïnvloeden. Na het vaststellen van een behandeleffect (of na de maximale behandelduur) worden de hersenen en overige organen.

- Klinische fenotypering door middel van dagelijkse observaties, wegen en standaard mobiliteit (motorische) testen. Zodra er een significant verschil wordt gemeten stopt het experiment. [redacted] Deze testen worden gebruikt om de mobiliteits- en krachtveranderingen bij deze dieren te kunnen meten. Deze testen geven maximaal licht ongerief en hebben geen nadelige gevolgen voor de dieren.
- Pathologie van uitgenomen hersenen (immuun) histologie
- Genexpressie in hersenen (moleculaire analyses: [redacted]
- Genexpressie en celmorfologie in overige organen (bijv. lever, nieren en pancreas) voor analyses van eventuele neveneffecten van de interventies.

De bovengenoemde (vervolg) experimenten zijn hieronder opgesplitst in twee tabellen. **Tabel 1** beschrijft het nu al lopende experiment. **Tabel 2** bevat de interventies bij de hierboven besproken verschillende type experimenten: [redacted] aanpak (2A), [redacted] interventies d.m.v. kruisingen (2B) en [redacted] aanpak (2C). Experiment 2 omschrijft de samenvatting wat bij de interventie [redacted] targetmodulatie wordt uitgevoerd.

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.

Tabel 1: Interventies bij experiment 1: [redacted] modulatie van de [redacted] route [redacted]

Interventie door middel van [redacted]	Toedienings- Route, frequentie	Behandelduur
[redacted] **test groep* of controle groep**	I.P. 1x per dag*	Max. 12 maanden
mobiliteitstesten	Max. 4	Max. 10 minuten per test
Bloedafnames (wangprik of staart max volume enkele druppels)	Max. 2x, met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname

***) N.B. Nogmaals,** dit experiment is begin 2017 gestart, maar is ook in deze aanvraag meegenomen omdat de proef waarschijnlijk doorloopt in 2018 ivm de fok van voldoende dieren voor experiment. Met het ook opnemen in deze aanvraag wordt voorkomen dat een amendement moet worden aangevraagd. Voor alle duidelijkheid: het experiment wordt maar éénmalig uitgevoerd.

***Toelichting:**
Dieren worden dagelijks i.p. met [redacted] of controle vehiculum behandeld gedurende maximaal 6 maanden (voor de [redacted] [redacted] muizen) of maximaal 12 maanden (voor de [redacted] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken (presymptomatisch). Er is ruime ervaring met het zeer langdurig i.p. injecteren van muizen, waarbij retrospectief samen met de IvD het ongerief op matig is vastgesteld. [redacted] wordt in zuivere vorm en in f[redacted] geschikt oplosmiddel toegediend, zodat verklevingen in de buikholte worden voorkomen. De [redacted] muis vertoont het [redacted] fenotype op een eerdere leeftijd waardoor effecten sneller zichtbaar zijn, maar ook de kans bestaat dat eerder een humaan eindpunt moet worden toegepast. De [redacted] muis vertoont het fenotype op een latere leeftijd, waardoor effecten pas na langere tijd duidelijk zichtbaar zijn.

Tabel 2: Overzicht van behandelingen uitgevoerd in experimenten 2A, 2B, 2C en 3.

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur
2A: [redacted] behandeling	injectie i.p. oraal, i.v. of s.c.	Max. 1x daags	Max. 12 maanden
2B: [redacted] interventies	Kruisen muizenstammen; dagelijkse observaties	Max dagelijkse observaties	Max. 1 jaar of HEP
2C [redacted] interventies	Aangepast dieet	Dagelijks	Max. 1 jaar
2A, 2B, 2C, 3	mobiliteitstesten	Max 4 x	Max. 10 minuten per test
2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max 2 x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname
2 A, 2B, 2C, 3	Doden (cervicale dislocatie of terminale anesthesie, uitname organen)	Eenmalig	Max 1 min

Toelichting interventies:

- **Mobiliteitstesten (max licht ongerief)**
  Mobiliteitstesten ([redacted]) zoals [redacted] eerder gepubliceerd.

- **Bloedafname tbv analyse farmacon/dieet:** de concentratie [redacted] wordt tijdens het experiment in bloed (afgenomen middels wangprik) bepaald en aan het einde in bloed en in de hersenen aan het einde van het experiment gemeten (terminaal bloedmonster).

- [redacted]
  Zie toelichting bij Experiment 1 ([redacted]

- [redacted]

Dieren worden met een [redacted] behandeld waarin [redacted] vanaf jonge leeftijd tot een leeftijd van maximaal 6 maanden (voor de [redacted] muizen) of maximaal 1 jaar (voor de [redacted] muizen), omdat op dit tijdstip zeker een significant verschil duidelijk meetbaar zal zijn in een mobiliteitstest. Dagelijkse tot wekelijkse observaties van de dieren afhankelijk van dieet (bij dagelijks voerafwegingen ook dagelijkse observatie van gewicht en diergedrag).

- **Ex-vivo analyses op breintjes** m.b.v. (immuun) histologie en gen/eiwit analyses ([redacted]). Breintjes worden histopathologisch geanalyseerd. Met de resultaten uit bovengenoemde experimenten kunnen we uitzoeken of de [redacted] interventie gunstig of ongunstig zal zijn op [redacted] pathologie.

Toelichting experiment 3
We kunnen met de gegevens uit bijlagen 1, 2 (experimenten 2A-C) en 3 een verfijning aanbrengen in de [redacted] analyse om een duidelijke afwijking van een moleculaire route specifiek in de aangetaste cel-populatie in het [redacted] brein (bepaald in bijlage 1). Dit experiment is conditioneel aan de bevindingen uit bijlage 1 (welk cel-autonome lijn bootst het best de [redacted] ziekte in muizen na) en uit bijlage 2 (onderdeel 2A-C). In een pilot zullen we de specificiteit van de [redacted] bepalen middels histologie. We zullen de lijn bij GO (voldoende [redacted] expressie) door de tijd volgen en de analyses uitvoeren op 3 leeftijden (1-2 maanden [presymptomatisch], 4-5 maanden [mild symptomatisch], maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). Bij de laatste leeftijd zullen we ook mobiliteitstesten uitvoeren.
Dit laatste experiment geldt als "proof of the pudding" waarbij eerder vastgestelde afwijkingen in [redacted] worden bevestigd en [redacted] gecorreleerd kunnen worden aan ziekte parameters.

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

In het algemeen geldt voor de experimenten in deze bijlage:

N=16 per testgroep voor mobiliteitstesten (op grond van literatuur gegevens ([redacted]), waarvan na afloop n=11 - 12 door cervicale dislocatie worden geëuthanaseerd voor moleculaire analyses en histologie op vers weefsel en n=4 voor perfusie onder anesthesie [voor histologische analyses] (totaal n=16).

Power analyse van analyse van genexpressie voor pilot vermeld bij 2A:
De [redacted] analyse methode voor [redacted] is het moeilijkst meetbaar voor target [redacted]. Wij willen een verschil van 15% kunnen meten (wt en mutant verschillen zonder interventie 20% van elkaar). De standaard deviatie is 0,001772, gemiddelde expressie in [redacted] dieren is 0,025667. Op basis van deze getallen komen wij op een noodzakelijk aantal dieren van 4.

B. De dieren

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

Diersoort: muis (mus musculus) en genetisch gemodificeerde dieren, afkomstig van leveranciers of onderzoeksgroepen of eigen fok.
Muizenstammen:
Controle stammen: C57BL/6J, [redacted]
Kruisingen: C57BL/6J x test lijn, [redacted] x test lijn en [redacted] x test lijn
Testlijnen: bijvoorbeeld [redacted]
Deze muizenlijnen hebben van zichzelf geen fenotype.

Herkomst: eigen fok of aanschaf via officiële leverancier of onderzoeksinstituut.
Sekse: mannetjes. Een van de parameters is [redacted] analyses. Door verschillen in o.a. [redacted] is statistische analyse van deze experimenten ondoenlijk als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons

inziens noodzakelijk.

Tabel 3: Totaal aantallen dieren:

Experimenten	Minimum aantal	Maximum aantal
1	68	68
2A	96	168 + 672
2B	96+48	720
2C	384	1344
3	12	12 + 96
Totaal	**704**	**3080**

Aantallen en levensstadia worden hieronder uitgelegd per experiment.

Experiment 1:
De dieren gebruikt in experiment 1 liggen vast (n=68 in totaal) omdat dit een lopend experiment betreft op

een 'oude' vergunning (<14 dec 2014). De aantallen zijn hier wel meengenomen omdat het experiment waarschijnlijk doorloopt in 2018. Behandeling is gestart op een leeftijd van 6-8 weken en duurt maximaal 6 maanden voor [redacted] en 12 maanden voor [redacted].

Experiment 2A:
Aantallen pilot:
Per kruising van C57BL/6J, [redacted] en eventueel [redacted] *x* een gen-specifieke lijn (3 test lijnen) en 3 controle lijnen C57BL/6J, [redacted] en eventueel [redacted] (6 lijnen in totaal):
Groepsgrootte: Pilot n=4, minimaal 4, maximaal 6 lijnen per kruising (maximaal 4x6=24 dieren).
Deze flow wordt minimaal voor 4 (bij resultaat 1D) en maximaal voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij Resultaat 1C) [Tabel 2a en 2b]. In totaal (alle kruisingen maximaal ingeschat):

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen, pilots 6 x 4 x 5 = 120 muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen Pilots 6 x 4 x 7 = 168 muizen;

Aantallen karakterisering nieuwe lijnen:
Controle lijnen: C57BL/6J, [redacted] en [redacted]
Testlijnen: C57BL/6J x test lijn, [redacted] x test lijn en [redacted] x test lijn
Groepsgrootte:
Aantal dieren voor overleving en mobiliteitstesten is n=16 per groep. Deze flow wordt maximaal voor vijf kruisingen (bij Resultaat 1A of 1C) of voor zeven kruisingen uitgevoerd (bij GO Resultaat 1B).

- Bij resultaat 1A: Maximaal 5 kruisingen, 6 x 16 x 5 = 480 muizen;
- Bij resultaat 1B, 1C: Maximaal: 7 kruisingen: 6 x 16 x 7 = 672 muizen;

Als twee of meer lijnen tegelijk gekruist kunnen worden, kunnen de F1 van de kruisingen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 controle groep. Deze opzet vermindert het aantal dieren met 48 (1 controle groep is 48). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten of de kruisingen tegelijk kunnen worden uitgevoerd.

In de lijnen worden de ziekteparameters onderzocht vanaf een jonge leeftijd tot een maximale leeftijd (1 jaar voor [redacted] en C57BL/6J en 6 maanden [redacted]) of eerder bij humaan eindpunt.

Experiment 2B:
Per experiment 3 behandelingen: 2 controle (vehiculum en farmaconspecificiteit) en 1 testbehandeling (stof als [redacted]). Gebruikte Lijnen: 2 Testlijnen: [redacted]: n=16 (mobiliteitstesten) per groep,
2 Controle lijnen: C57BL/6J en bijv [redacted] x target-gen omlaag: n=8 per controle groep per behandeling,
Aantal dieren is maximaal: 3 x 2 x 16 = 96 dieren (test) en 3x 2 x 8 = 48 (controle) is totaal maximaal 144 dieren per experiment. Er zullen maximaal 5 verschillende experimenten worden uitgevoerd: 144*5= 720 dieren. Als een vehiculum gedeeld kan worden (bijv vehiculum van stof A en B is saline), kunnen 2 stoffen naast elkaar getoetst worden met slechts 1 vehiculum injectie controle groep. Dit scheelt dan 48 dieren (2 controle groepen van 8 en 2 lijnen uit test groep van beide 16 => 2x8+2x16=48). Dit is niet vooraf in te schatten omdat we nog niet weten welke stoffen we gaan testen.

Experiment 2C:
Per experiment 3 lijnen: 1 controle lijn: C57BL/6J en 2 test lijnen: [redacted] en [redacted] Dieraantallen: n=16 (mobiliteitstesten / overleving per groep.
Behandelingen: Maximaal 18 test behandelingen, zoals [redacted]) en [redacted] (4 aminozuren, 4 verschillende concentraties).
Minimaal 2 maximaal 10 controle behandelingen: [redacted].
Mogelijk is het niet logistiek haalbaar om dit in 1 experiment uitvoeren en zullen we het experiment opsplitsen in 5 onderdelen ([redacted]). Het aantal controle behandelingen neemt dan toe van 2 naar 10.
Totaal aantal dieren is minimaal (alles parallel, met gedeelde controle behandelingen):
3 lijnen x 20 behandelingen x 16 dieren (n=960)
Totaal aantal dieren is maximaal (5 rondes, met 10 controle behandelingen):
3 lijnen x 28 behandelingen x 16 dieren (n=1344)

Experiment 3:
[redacted] met 3 testlijnen:
[redacted] x conditionele-CRE x [redacted], C57Bl/6J x [redacted], Lijn 2A x [redacted] x [redacted] en 3 controle lijnen (alleen voor pilot): [redacted] C57BL/6J en de lijn die uit 2A komt (Lijn 2B x [redacted]

- Pilot experiment (is [redacted] en beïnvloedt de [redacted]) Per groep: 2 dieren per lijn, 1 leeftijd 4-5 maanden oud. Histologische analyse (aantonen of de cellen specifiek [redacted] brengen). Aantal dieren is 2 dieren x 6 lijnen=12 dieren.
- **Als** de [redacted] zoals verwacht [redacted] tot expressie komt en geen onverwacht ongerief geeft, **dan** zal [redacted] analyses in hersenen van mannelijke dieren worden uitgevoerd op de 3 testlijnen, met 8 dieren per lijn, 2 leeftijden ((1-2 maanden [presymptomatisch], 5 maanden [mild symptomatisch], en 16 dieren voor mobiliteitstesten per lijn bij leeftijd maximaal 1 jaar of eerder door humaan eindpunt [symptomatisch]). 8 dieren zijn naar alle waarschijnlijkheid nodig voor het isoleren van [redacted]-ribosomen (eerder hebben we [redacted] analyses op heel brein zonder [redacted] uitgevoerd op n=4). Aantal dieren is 8 dieren x 3 lijnen x 2 leeftijden + 16 x 3 x 1 leeftijd= 96 dieren.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
[redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast is het niet wettelijk toegestaan noch ethisch verantwoord om [redacted] bij mensen toe te passen indien proefdieronderzoek niet heeft uitgewezen dat de middelen veilig en effectief zijn. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (mn. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

Vermindering:
Bij het creëren van nieuwe lijnen door kruisingen (2A, 3) zal een Pilot experiment in n=4 per lijn worden uitgevoerd om afwezigheid van extra ongerief te bevestigen. We beslissen dan of de [redacted] lijn [redacted] noodzakelijk is om te genereren, waarbij we snel tot een keuze komen welke genetisch gemodificeerde muizen voor verdere analyses gebruikt worden.
Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Door kruisingen van verschillende lijnen tegelijk uit te voeren kunnen we het aantal controle dieren terugbrengen met 48. Bij [redacted] interventie studies zal waar mogelijk een naïeve, onbehandelde groep (controle groep) dier worden weggelaten indien ook een groep dieren met een passend vehiculum als saline wordt meegenomen. Dit alles zal met de IvD worden afgestemd.

Verfijning
Zodra blijkt dat fenotypische veranderingen na interventie significant worden waargenomen zullen we de experimenten stoppen en niet tot de maximale tijd laten doorlopen. De onderzoekers en biotechnici hebben jarenlange ervaring met de beschreven ziektemodellen en technische interventies. Dieren worden gehuisvest in kooien met kooiverrijking en krijgen voer en gelpacks of pap op de bodem zodra een fenotype zichtbaar 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.

Het neurologisch fenotype van muizen met [redacted] uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren makkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

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.

Mannelijke dieren worden solitair gehuisvest i.v.m. onderlinge vechtpartijen bij groepshuisvesting.

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?

Het dagelijks i.p. behandelen wordt door zeer ervaren biotechnici uitgevoerd, waarbij is vast gesteld dat het meeste ongerief wordt veroorzaakt door oppakken van de dieren. Retrospectief werd daarbij het ongerief op maximaal matig (na maanden toedienen) vastgesteld. Er worden geen complicaties verwacht doordat de [redacted] zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken [redacted] ongerief veroorzaken. Het fenotype [redacted] is eerder door de dierenarts gezien en mede beoordeeld op ongerief. De ziekte veroorzaakt motorische afwijkingen (=ongerief) in de dieren maar geen pijn. Kenmerken van [redacted] in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water) en geringe gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren. Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.
In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De criteria voor de humane eindpunten zijn als volgt gedefinieerd: 15% gewichtverlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

Ca. 20%: zou maximaal verwacht kunnen worden bij [redacted] dieren die worden behandeld met controle [redacted] of vehikel of die geen genetische aanpassing hebben.

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.

Inschatting ongerief per experiment:

Tabel 4: Inschatting ongerief per handeling:

Experiment en interventie	Interventie	Frequentie	duur	Maximaal ongerief
1 & 2A: [redacted] behandeling	injectie i.p. oraal, i.v. of s.c.	Max. 1 * daags	Max 12 maanden	Licht of matig; afhankelijk van de duur. Zodra er een effect wordt gezien stopt de behandeling
2B: [redacted] interventies	[redacted] muizenstammen; dagelijkse observaties	Max dagelijkse observaties	Max. 12 maanden	Max. matig
2C [redacted] interventies	Aangepast [redacted]	Max dagelijkse observaties	Max. 1 jaar	Max. matig
1, 2A, 2B, 2C, 3	mobiliteitstesten	Max. 4x	Max. 10 minuten per test	licht
1, 2A, 2B, 2C	bloedafnames	Max. 2x (wangprik of staart max volume enkele druppels), met minimaal 1 week er tussen	Max. 5 minuten per afname	licht
1, 2 A, 2B, 2C, 3	Doden (cervicale dislocatie of terminale anesthesie, uitname organen)	eenmalig	Max. 1 min	Licht of terminaal
1, 2A, 2B,2C, 3	[redacted] Fenotype als gevolg van mutatie		~2-7 maanden	Max matig

Tabel 5: Maximale cumulatieve ongerief in % van gebruikte dieren in deze bijlage

Aantal dieren	% met ongerief "licht"	% met ongerief "matig"
Maximaal 3080	Max. 20%	Max. 80%

De behandelingen zijn in principe gericht op verbetering van het fenotype van [redacted] lijnen.

Vóórdat ernstig ongerief optreedt zullen de muizen geëuthanaseerd worden (=HEP), het totale ongerief is dus maximaal matig.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De hersenen moeten worden uitgenomen voor verdere ex-vivo analyse.

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

15.

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3 Type dierproef: Verbetering van [redacted] functie: ex-vivo analyses na isolatie van o.a [redacted] uit muizen met [redacted] in celkweek

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

We willen de mRNAs/eiwitten opsporen die een veranderde [redacted] vertonen in muizen met [redacted] ten opzichte van wild-type (WT) dieren, omdat deze mogelijk een rol spelen bij de ziekte. Dit gebeurt met ex-vivo analyse van patiënten materiaal en in parallel met muizen materiaal.

Ex-vivo onderzoek op hersenen van onbehandelde muizen met [redacted] en WT controles:

A1&3: Ex-vivo (in celkweek) worden de volgende parameters onderzocht op coupes van hersenen uit muizen tussen genotypen en regio's:

- de mate van schade, [redacted]
- specifiek de [redacted] regio's;
- de mate van [redacted] door middel van fluorescentie immuunhistochemie.

A2: Ex-vivo eiwit analyse met behulp van gefocuste [redacted] van [redacted] geisoleerd uit muizen van verschillende leeftijden/ziektestadia in [redacted] (leeftijd ~P0, ~P14, ~P42, ~P90, ~P120, ~P196, en max ~12 maanden of eerder op het humane eindpunt).

- [redacted]. Hierbij wordt bepaald welke eiwit(ten) veranderd is (zijn), gerelateerd aan verschillen in [redacted].
- **Belangrijk is de translationele aanpak:** Om de resultaten die we in de muizen vinden te

valideren zullen we eenzelfde [redacted] uitvoeren op menselijk materiaal (hersenweefsel van [redacted] patiënten van verschillende ziekte ernst ten opzichte van controles) en onderzoek doen naar het [redacted]

B: Wat is de impact van [redacted] (mbv celkweek): uitleesparameters: [redacted] activatie wordt bepaald met immuun fluorescentie, flow cytometrie en sandwich ELISA voor een aantal standaard [redacted] markers. Daarnaast zullen de zelfde experimenten worden uitgevoerd met [redacted] van [redacted] stof van patiënten en controles; de cellen zijn al aanwezig in het lab.

C: Wat is de impact van [redacted] astrocyten op de [redacted])? Dit betreft ex-vivo onderzoek op breintjes van muizen met [redacted] in verschillende ziekte stadia. [redacted]

D1 Bestudering van [redacted] kweken na behandeling met verschillende [redacted]. Primaire uitkomst parameters: [redacted]. 3D kweken zijn geschikt voor al deze doeleinden en de technieken en analyses al geoptimaliseerd.

Go / no-go: als AI en AII geen significant resultaat laat zien

A4: In-vivo inductie het endogene herstelpotentieel bij diverse [redacted] in vivo bestudeerd bij ~5 maanden oude [redacted] en WT muizen waarbij [redacted] (controle) geïnduceerd.

- Uitleesparameters: ex-vivo op hersen materiaal:
  - [redacted]
-

In-vivo onderzoek op hersenen van behandelde muizen met [redacted] en WT controles:

D2: **in-vivo:** onderzoek naar [redacted] en [redacted] in de witte stof in het [redacted] van ~5 maanden oude muizen na behandeling van [redacted] vs. controle dieren. Uitkomst parameters: celproliferatie en reactie (reactive gliose) op dag 1, 5 (complete schade), 14, 21 (piek van weefsel remodelling), en ~40 dagen (compleet herstel) op coupes van hersenen. Na de behandeling wordt per tijdspunt een deel van de muizen geëuthanaseerd en zullen de hersenen histologisch worden onderzocht.

Haalbaarheid: Alle noodzakelijke apparatuur is beschikbaar, en technieken en analyses zijn al geoptimaliseerd. Daarnaast zal de differentiële expressie in [redacted] en WT muizen van [redacted] uit punt A bevestigd worden. We willen muizen van verschillende leeftijden analyseren (~2 maanden: pre-symptomatisch stadium; ~5 maanden: gering klinisch symptomatisch stadium; ~12 maanden: evident klinisch symptomatisch stadium) om de relatie tussen [redacted] falen en [redacted] in kaart te brengen.

Translationeel: Daarnaast worden dezelfde experimenten uitgevoerd met [redacted] afkomstig uit [redacted] van [redacted] patiënten en controles. Deze cellen zijn al aanwezig in het lab om de muisdata met de humane situatie te vergelijken en de ziekte-specificiteit van de bevindingen te bepalen.
Wij verwachten dat [redacted] astrocyten geen normale interactie vertonen met endotheelcellen en dat [redacted] inductie en onderhoud bij [redacted] defect zijn. Wij zullen aantonen of een afwijkende eiwitexpressie hieraan ten grondslag ligt.

Humaan: de bevindingen van bovengenoemde experimenten zal worden bevestigd in menselijke [redacted] hersenweefsel en de specificiteit zal worden beoordeeld door vergelijking met andere [redacted] gekenmerkt door robuuste of juist onvoldoende [redacted].

Uit de experimenten uit bijlage 3 moet duidelijk worden welke [redacted] responses en [redacted] het succes of falen van [redacted] bepalen.

Referenties:

- [redacted]

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

Het betreft hier bijna volledig ex vivo analyses, op muizen in verschillende ziekte stadia (leeftijd) met wild type controles. De enige handeling, welke hier van toepassing is, is het doden van dieren op verschillende leeftijden om weefsel voor ex vivo analyses te verzamelen.

Tabel 1: Overzicht behandelingen, frequentie en duur per experiment

Experiment	Handeling	Duur	Frequentie
A1, A2, A3	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
A4	Intracraniele [redacted] onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Doden: uitname organen na doden		
B	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
C	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
D1	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig
D2	Of: Intracraniele behandeling, [redacted] onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Of: steekwond schade onder anesthesie	Kort, seconden	Eenmalig
	Doden: uitname organen na doden	Kort, seconden	Eenmalig

Uitleg van behandelingen:
Dieren waarin ook in-vivo handelingen worden verricht:
Experiment A4: [redacted] in vivo (alleen als A2 en A3 geen duidelijk resultaat laat zien)
Eenmaal intracraniale behandeling (injectie) met [redacted]
Gebruik van [redacted] en WT muizen (dag 0, 3, 7,14, 21 na behandeling).

Gebruik van mannelijke dieren voor [redacted] analyse, en van dieren van beide geslachten voor immuunhistochemie (IHC).

Experiment D1: 3D in vitro model van [redacted]
Geen behandeling in vivo, alleen uitname breinen.
Gebruik van [redacted] en WT muizen P0-P3 van beide geslachten. We hebben perinataal weefsel nodig omdat hersenplakjes van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

Experiment D2: [redacted] **in vivo**
Eenmalig behandeling in vivo met [redacted]).
Op dag 1, 5 (complete schade), 14 [redacted]), 21 (piek van weefsel [redacted]) en ~40 dagen (compleet herstel) na de verwonding zal een deel van de muizen worden geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie en zullen de hersenen worden ingevroren of in paraffine ingebed voor microscopisch onderzoek. Tevens op dag 5 (complete schade) en 21 (piek van [redacted]) na de verwonding zal een deel van de muizen worden geëuthanaseerd en zullen de hersenen worden gebruikt voor [redacted] analyse en daarna [redacted] voor validatie van de [redacted] resultaten.

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

Uit ervaring en uit literatuurgegevens zijn de berekende aantallen gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die nodig is voor de ex-vivo analyses per parameter. Daar waar mogelijk worden meerdere parameters in een brein onderzocht. .
Voor poweranalyse: alpha 0.05, 1-beta 0.8, Zalpha/2 1.96, Zbeta 0.84.

Punt A1: [redacted] **behandeling van** [redacted] **hersenplakken.**
Hersenplakjes van 300 µm; parameters: [redacted].
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.1/diff 0.1)^2 = **16**

Punt A2: Single-cell [redacted]**.**
Isolatie van [redacted]; ongeveer 50 cellen [redacted] uit een 6um-dik plakje, ongeveer 20 plakjes kunnen gesneden worden uit een brein; 3000 cellen (dus 3 hele breinen) noodzakelijk per sample voor [redacted].
3 experimenten, 7 levenstadia, 3 breinen = 63 breinen per genotype (geen statistische overwegingen)

Validatie experimenten [redacted])
4 breinen (1 helft voor [redacted] en 1 helft voor [redacted]/genotype
7 levensstadia/genotype
21 breinen per genotype
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.05/diff 0.1)^2 =**4 voor validatie**

Punt A3: [redacted] **co-kweken.**
De [redacted] worden uit E18 Bl6 pups geïsoleerd (beide geslachten). Bij het aantal muizen wordt voor 1 E18 nestje, 1 muis (moeder) gerekend. Een E18 nestje (gemiddeld 6 pups) geeft ~ 6 x 10^7 cellen. Na sorting blijven er ~1.8 x 10^6 [redacted] cellen over. Om genoeg OPC cellen te genereren voor 1 experiment hebben we naar verwachting 2 E18 nestjes nodig. [redacted] worden geïsoleerd uit [redacted] van E18 WT of [redacted] pups. Op basis van de mate van de regio, zijn er 1 nestje nodig voor de [redacted] maar 2 nestjes nodig voor de [redacted] (die een veel kleinere [redacted]).
Herhaling van experiment (n): 4
Aantal muizen: (4 (n) x 2 (nestjes; [redacted] x 2 (nestje: WT + [redacted]) = 16 muizen
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.1/diff 0.1)^2 = **16**

Punt A4: [redacted] **behandeling in vivo.**
[redacted] (mannelijke dieren): 9 breinen (zie boven) x genotype ([redacted] en WT) x tijdstip (voor behandeling en 3, 7, 14 en 21 dagen na behandeling) x behandeling ([redacted]).

[redacted] karakterisatie en [redacted] validatie door middel van [redacted] 6 half breinen x genotype ([redacted] en WT) x tijdstip (voor behandeling en 3, 7, 14 en 21 dagen na behandeling) x behandeling ([redacted]) x experiment ([redacted], dezelfde brein kan gehalveerd worden en gebruikt voor beide doelen).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.34/diff 0.1)^2 = **180 voor** [redacted]
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.34/diff 0.17)^2 = **60 voor validatie** [redacted]

Punt B: [redacted] **co-cultures.**
We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.
Voor imuunhistochemie: totaal 18 eiwitten, 3 eiwitten samen kleuren → 6 kleuringen; 1 time point; 4 genotype combinaties: WT astrocyten + [redacted], WT [redacted] +WT [redacted] + [redacted] + WT [redacted] N=3; 3 experimenten:
→1 time point x 6 kleuringen x 3=N x 3 experimenten = 54 wells/genotype combinatie
→1 time point x 6 kleuringen x 3=N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 216 wells totaal = 9 x 24-well plates totaal

Flow-cytometrie: 1 time point; 4 condities/genotype: WT [redacted] + [redacted], WT [redacted] +WT [redacted] + WT [redacted] N=3; 3 experimenten:
→1 time point x 3 N x 3 experimenten = 9 wells/genotype combinatie
→1 time point x 3 N x 3 experimenten x 4 genotype combinatie = 36 wells totaal= 1.5 x 24-well plates totaal

[redacted]: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot [redacted] worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype combinaties: WT [redacted] + [redacted], WT [redacted] +WT [redacted] + WT [redacted] N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal= 5 x 24-well plates totaal

[redacted] totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de [redacted] worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 1 time point; 4 genotype combinaties: WT [redacted] + [redacted], WT [redacted] +WT [redacted] + WT [redacted] N=6, maar pool 3 monsters → 2; 3 experimenten:
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten = 30 wells/genotype combinatie
→1 time point x 5 kleuringen x 2 N x 3 experimenten x 4 genotype combinaties = 120 wells totaal = 5 x 24-well plates totaal.

Totaal punt B: Minstens 21 x 24-well plates 123 wells / genotype combinatie; totaal 4 combinaties
→Totaal 246 wells / genotype (WT of [redacted])

1 muis pup = ca. $3.5X10^6$ cellen, max passage (P) 2: plate 30.000 cellen/well P0-1, plate 50.000 cellen/well P2. Nodig 246 x 50.000 = $12.3x10^6$ cellen, 1 P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca. $24.5x10^6$ cellen, dus 1 nestje nodig voor een experiment. De fok voor [redacted] is niet anders uitvoerbaar dan [redacted] Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en [redacted] cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.
Om de drie experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes / genotype (7 pups/nestje) → 21 pups / genotype = 21 WT + 21 homozygote [redacted] + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

Punt C1: astrocyt-endotheelcellen co-cultures.
We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.
[redacted] 3 experimenten x 6 tijdstippen (2 uur en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen ([redacted] en WT) x N=3: 4.5 x 24 well plates.
[redacted] kolommen: 3 experimenten x 6 tijdstippen (2 h en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen ([redacted] en

WT) x N=3: 4.5 x 24 well plates.
Immuunfluorescentie: 2 experimenten x 6 tijdstippen (2 h en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen ([redacted] en WT) x N=3 x 6 kleuringen: 18 x 24 well plates.
Western blot/ELISA: 3 experimenten x 6 tijdstippen (2 h en 1, 2, 4, 6 en 8 dagen) x 2 genotypen ([redacted] en WT) x N=2: 15 x 24 well plates.

Totaal 450 wells per genotype, 900 wells voor beide genotypen = 38x24 well plates, 1 muis pup = ~ 3,5 x 10^6 cellen. Passage 2: plate 30.000 cellen / well passage 0-1, 50.000 cellen / well passage 2. Noodzakelijk 450 x 50.000 = 22,5 x 10^6 cellen per genotype, 1 P1-3 nestje geeft ~ 7 pups, 7 x 3,5 x 10^6 cellen = 24.5 x 10^6 cellen. De fok voor [redacted]) is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted])x null/null ([redacted] Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen [redacted]) cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment. Om alle experimenten uit te voeren met 3 aparte batches van cellen → 3 nestjes (7 pups/nestje) / genotype = 21 WT + 21 homozygote [redacted] + 21 heterozygote pups + 9 moeders.

Punt C2: onderzoek naar [redacted] in vivo/ex vivo, [redacted].
Gebruik van dieren van beide geslachten; ~1, ~4 en ~7 maanden oude dieren (dieren zonder symptomen, dieren met lichte ziekte, dieren met ernstiger ziekte; om de [redacted] functie te bestuderen door het ziekteverloop en door verschillende maten van ziekte ernst); euthanasie door cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.
[redacted] en andere soorten [redacted] onderzoek, [redacted] bevindingen: 10 halve breinen x genotype ([redacted] en WT) x 3 leeftijden (~1, ~4 en ~7 maanden): 10 X 2 X 3 = 60 halve breinen = **30 breinen** (15 [redacted] 15 WT).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.2/diff 0.25)^2 = **10**
Nat/droog gewicht: 3 breinen x genotype ([redacted] en WT) x 3 leeftijden (~1, ~4 en ~7 maanden): 3 X 2 X 3 = **18 breinen** (9 [redacted] en 9 WT).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.1/diff 0.25)^2 = **3**
[redacted]: 9 breinen (zie boven) x genotype ([redacted] en WT) x 3 leeftijden (~1, ~4 en ~7 maanden): 9 X 2 X 3 = **54 breinen** (27 [redacted] 27 WT).
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.26/diff 0.35)^2 **= 9**

Punt D1: [redacted] model van [redacted].
Gebruik van [redacted] en WT muizen, P0-P3, van beide geslachten, geëuthanaseerd door middel van cervicale dislocatie. We hebben perinataal weefsel nodig omdat cellen van oudere muizen in kweek snel dood gaan.

[redacted]: totaal 18 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren → 9 kleuringen (9 plakjes); 4 tijdstippen (1, 5, 14 and 21 dagen na behandeling); 2 condities: [redacted]; 2 genotypen (WT, [redacted] N=3; 3 experimenten:
→4 tijdstippen x 9 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 648 secties/genotype ; 2 secties per well; 324 wells; = **18** x 24-well platen per genotype
→18 platen x 2 genotypen (WT, [redacted] = 36 x 24-well platen totaal

WB/ELISA: totaal 18 eiwitten, er wordt verwacht dat 50% van de eiwitten anders tot expressie worden gebracht = 9 eiwitten, 2 eiwitten samen kleuren = 5 kleuringen; 4 tijdstippen (1, 5, 14 en 21 dagen na behandeling); 2 condities:[redacted]; 2 genotypen (WT, [redacted] N=3, 3 experimenten:
→4 tijdstippen x 5 kleuringen x N=3 x 3 experimenten x 2 condities/genotype = 240 kleuringen/genotype
240 = 20* 12 wells platen nodig (equivalent aan ongeveer **40** 24 wells platen) per genotype
→40 24 wells platen x 2 genotypen (WT, [redacted] = 80 x 24-well platen totaal

[redacted]: 4 tijdstippen (1, 5, 14 en 21 dagen na behandeling); 2 condities: [redacted] versus [redacted] 2 genotypen (WT, [redacted] N=3; 2 experimenten:
→4 tijdstippen x N=3 x 2 experimenten x 2 condities/genotype = 48 samples/genotype ; 1 sample kost 1 10 cm plaat is equivalent aan ~36 x 24 wells platen/genotype
→**1728** x 24 well plates x 2 genotypen (WT, [redacted] = 3456 x 24-well plates totaal

Voor alle hierboven genoemde experimenten:
Totaal minstens 1786 x24-well platen, totaal 42864 wells / genotype

50.000 cellen/well (passage P2).
Totaal aantal cellen is 42864 x 50000= 2143,2 X10^6 cellen/per genotype
1 muis pup = ca. 3.5X10^6 cellen
613 pups nodig per genotype = 613 WT + 613 homozygote [redacted] + 613 heterozygote pups + 88 moeders.

P0-3 nestje geeft ca. 7 pups = ca. 24.5x10^6 cellen dus 88 nestjes per genotype nodig voor alle experimenten. De fok voor null/null ([redacted] is niet anders uitvoerbaar dan null/wt ([redacted])x null/null ([redacted] Genotypering vindt plaats op de cellen (achteraf) en alleen null/null ([redacted] cellen worden voor het experiment gebruikt. Het aantal dieren is daarom 2 keer hoger dan noodzakelijk voor dit experiment.

Punt D2: [redacted] **in vivo**
Gebruik van mannelijke dieren of beide geslachten afhankelijk van de experiment; ~4 maanden oude dieren; cervicale dislocatie. Verwachte drop-out 0%.

Isolatie van [redacted] **door middel van** [redacted]; ongeveer 50 cellen kunnen geïsoleerd worden uit een 6um-dik plakje, ongeveer 20 plakjes kunnen gesneden worden uit een brein; 3000 cellen (dus 3 hele breinen) noodzakelijk per sample voor [redacted] (n=1 bepaling).

3 experimenten x 2 genotype ([redacted] en WT) x 2 tijdstip (5 en 21 dagen na behandeling) x 4 behandeling ([redacted]). **24 dieren per genotype**

[redacted] karakterisatie inclusief extra tijdspunten: 4 breinen (1 helft [redacted] en 1 helft [redacted] x 2 genotype ([redacted] en WT) x 5 tijdstip (1, 5, 14, 21 en ~40 dagen na behandeling) x 4 behandeling ([redacted] **80** dieren per genotype
n-needed = 2*((Zalpha/2+Zbeta)*SD 0.05/diff 0.1)^2 =4 **voor validatie**

B. De dieren

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

Muis, *mus musculus;* Wild type: C57Bl/6J en Homozygote [redacted]
Beide stammen worden gefokt in het proefdiercentrum. Voor uitname pups op E18 worden de pups via hysterectomie bij de moeder uitgenomen. De moeder wordt na de hysterectomie onder anesthesie onmiddellijk gedood. Pups (P0-P2) worden spontaan geboren.

Tabel 2: berekening aantallen dieren

experiment	soort	sexe	~leeftijd	aantal
A1	[redacted]	beide	perinataal	16
	wt	beide	perinataal	16
A2	[redacted]	Man*	P0, P14, P42, P90, P120, P196, HEP	180
	wt	man*	P0, P14, P42, P90, P120, P196, HEP	180
A3	wt	beide	E18	16
	[redacted]	beide	E18	16
			Moederdier voor A1 & A3	10
A4	[redacted]	beide	5-6 maanden	240

	wt	beide	5-6 maanden	240
B	[redacted]	beide	P0-P3	21
	[redacted]	beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C1	[redacted]	beide	P0-P3	21
	[redacted]	beide	P0-P3	21
	wt	beide	P0-P3	21
C2	[redacted]	beide	1, 4 en 7 mnd	51
	wt	beide	1, 4 en 7 mnd	51
D1	[redacted]	beide	P0-P3	613
	[redacted]	beide	P0-P3	613
	wt	beide	P0-P3	613
D2	[redacted]	beide	4 mnd – 4 mnd +40dagen maximaal	102
	wt	beide	4 mnd-4 mnd +40dagen maximaal	102
			totaal:	**3185**

Totaal aantal dieren voor deze bijlagen: 3185 dieren
*)
Door verschillen in [redacted] is statistische analyse van deze experimenten ondoenlijk als mannetjes en vrouwtjes muizen in 1 experiment zitten. Door mannetjes te gebruiken duurt het experiment korter. Sekse verschillen leiden daarnaast tot "ruis" in de data sets en zullen het benodigd aantal dieren omhoog doen gaan als we het verwachte effect significant kunnen meten. Het gebruik van mannetjes is ons inziens noodzakelijk.

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 is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan lymfoblasten (gekweekte witte bloedcellen) van [redacted] patiënten. Wij hebben

gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met fibroblasten van patiënten (gekweekte huidcellen). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. [redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (m.n. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat.

Vermindering:
De groepsgrootte is statistisch bepaald of gebaseerd op de hoeveelheid materiaal die ex-vivo nodig is voor de analyses. Waar mogelijk worden breintjes gedeeld voor meerdere parameters.

Verfijning
Het betreft bijna uitsluitend onderzoek ex-vivo omdat we instaat zijn verfijnd onderzoek uit te voeren m.b.v. [redacted] kweken. We hebben in onze groep veel ervaring met intracerebrale injecties in het kader van de ontwikkeling van [redacted]

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

Het neurologisch fenotype van muizen met [redacted] uit zich als een motorische stoornis, waarbij de muizen niet goed meer op de achterpoten kunnen lopen. De muizen hebben dan problemen met hun evenwicht en coördinatie en zetten de achterpoten wat naar buiten gedraaid neer om hun balans te verbeteren. Zodra dit optreedt wordt voer op de bodem van de kooi gelegd zodat de dieren gemakkelijk bij hun voer kunnen komen. Er treedt geen evidente mentale stoornis op. De muizen vertonen exploratief gedrag, verzorgen hun vacht goed en blijven goed op gewicht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. Indien nodig worden mannelijke muizen solitair gehuisvest om onderling vechten te voorkomen.

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.

Adequate anesthesie en perioperatieve pijnbestrijding zal worden toegepast bij bv intracraniële injecties en zal in het werkprotocol worden afgestemd met de IvD.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Kenmerken van [redacted] ziekte in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water); gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De ataxie is een typisch verschijnsel van een motorische handicap en wordt veroorzaakt door verdwijnen van de witte stof uit de hersenen.

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

Dagelijkse observaties van loopgedrag van de dieren.
Voer onder in de kooi en afhankelijk van het type kooi waterfles met lange tuit.
De motorische afwijkingen veroorzaken ongerief maar die mogen niet leiden tot verminderde voerinname of verminderde verzorging van de vacht. Er wordt voer in de kooi gelegd (losse brokjes of pap). Het gewicht wordt gemonitord (dagelijks). Voordat de dieren gaan lijden, zullen we ze uit de proef halen.
In overleg met de IvD zal een score lijst worden opgesteld voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies).

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De volgende criteria worden gehanteerd: 15% gewichtverlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

~ 1%

K. Classificatie van ongerief

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

-

- Intracraniele injecties onder anesthesie: licht tot maximaal matig
- Muis met fenotype (licht of matig, dit wordt achteraf bepaald en is nu als maximaal matig weergegeven) of toepassen HEP i.v.m. progressie van aangetast fenotype: matig (om ernstig te voorkomen)
- Uitname hersenen van pups na doden : licht

Tabel 3: aantallen dieren en inschatting maximaal ondervonden ongerief

Experiment	Licht	Matig
A1	32	
A2	280	80*
A3	42	
A4		480*
B	63	
C1	63	
C2	51	51*
D1	1839	
D2		204*

** Dit betreft muizen met ongerief als gevolg van behandeling en/of fenotype.*

Het cumulatieve ongerief is licht voor 2370 muizen (~ 74%).
Het cumulatieve ongerief is matig voor 815 muizen (~ 26%).

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het isoleren van de verschillende celtypen uit de breintjes.

Decapitatie wordt toegepast indien de pups te jong zijn om cervicale dislocatie toe te passen. Er is geen andere manier mogelijk om de jonge pups te doden waarbij hun hersenen intact blijven, hun schedel is erg kwetsbaar (bij cervicale dislocatie zullen de hersenen beschadigen). Deze manier van doden is noodzakelijk voor het verdere weefselonderzoek en is ook in eerdere vergunde aanvragen toegekend.

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

16.

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.	[redacted]
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	[redacted]
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 4 Type dierproef: Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted]

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

[redacted] pathologie is aanwezig in [redacted] de hersenen, maar varieert in ernst in de diverse fenotypen. Eerder onderzoek heeft aangetoond, dat de [redacted] niet goed functioneren door mutaties in de [redacted] en verantwoordelijk zijn voor de [redacted] pathologie. Onderzoek in muismodellen heeft laten zien dat [redacted]

Op dit moment hebben we met muismodel [redacted] een model dat de humane ziekte klinisch goed weergeeft. Eerste experimenten in ons lab hebben aangetoond dat we ook in staat zijn om in dat model de [redacted].
Daarnaast hebben we de [redacted] die de mogelijkheid biedt om een [redacted] te maken. [redacted] maken. De patiënt [redacted].
Naast het meer fundamentele onderzoek beschreven in bijlagen 1 – 3 zal dit onderzoek zich dus richten op de behandeling van [redacted] met behulp van [redacted]

Er zal gebruik gemaakt worden van de [redacted], verder te noemen [redacted] mutante stam, wanneer resultaten van de resultaten uit bijlage 1- 3 daar aanleiding toe geven).
Gezonde [redacted] uit controle muizen (C57BL/6J) of [redacted] worden ingespoten om zodoende te [redacted].
De effectiviteit van de behandeling wordt gemeten door het verbeterde motorisch gedrag te meten op volwassen leeftijd. Daarnaast zullen de dieren op verschillende tijdstippen [redacted] worden geëuthanaseerd. De hersenen zullen deels vers verzameld worden voor de analyse van [redacted] en [redacted], maar deels ook geperfundeerd voor ex-vivo onderzoek [redacted]
Daarnaast kan [redacted] therapie van [redacted] invloed hebben op [redacted] en onderdeel zijn van behandeling. Tenslotte hebben recente onderzoeken aangetoond dat een [redacted] kan bijdragen aan slecht herstel van de [redacted] en dat [redacted] nieuwe perspectieven biedt voor hersenaandoeningen.
Bekende toxische [redacted] patiënten, als ook nieuwe gegevens over [redacted] uit onderzoeken beschreven in bijlagen 1 – 3, worden [redacted] te verbeteren. Ook zullen de effecten van [redacted] in vivo, [redacted], worden getest. F[redacted] De dieren worden geanalyseerd zoals hierboven beschreven.

Fenotype in de gebruikte dieren in vergelijking met de humane patiënt:
Bij mensen veroorzaken homozygote mutaties in [redacted] (autosomaal recessief overervend) een progressieve aandoening van de [redacted]. Menselijke dragers (ouders, eventuele drager-familieleden) hebben geen verschijnselen. Alleen personen die twee mutaties hebben, krijgen de ziekte. [redacted] leidt vooral tot een verlies van motorische vaardigheden (vooral stoornis van de coördinatie = ataxie). De cognitieve vaardigheden zijn relatief gespaard. [redacted] leidt tot vroegtijdig overlijden, vaak na een periode van coma. Het ongerief bij [redacted] patiënten is gering; de motorische afwijkingen geven geen pijnmaar de belasting is zeer ernstig door de beperkingen. Als de ataxie op jonge leeftijd ontstaat, ervaren de kinderen hun motoriek als "normaal". Bijna alle patiënten hebben epilepsie, soms een status epilepticus. Aangezien epileptische aanvallen bij [redacted] vrijwel altijd met verlies van bewustzijn gepaard gaan, merken patiënten over het algemeen niets van hun aanvallen.

- Muizen met één mutatie zullen, net als menselijke dragers, naar verwachting geen enkel ongerief ondervinden. Voor [redacted] dat muizen die twee mutaties hebben vooral motorisch ongerief ondervinden.
- Bij de homozygoten [redacted]) muizen beginnen de motorische veranderingen pas na 4 maanden. Op dat moment is het ongerief gering. De dieren verzorgen zichzelf goed, eten normaal en planten zich voort. Op 5 maanden, worden de dieren wel uit de fok gehaald.
- Dieren worden vanaf 4 maanden extra gemonitord. Extra monitoren houdt in dat de dieren wekelijks worden 1) gewogen; 2) onderzocht op verzorging, huid en staart; 3) motorische afwijkingen (ataxie, epilepsie, grip); 4) reflex testen (oog, teen-spreid, grip). Dit wordt bijgehouden in een logboek. Bij belangrijke gewichtsafname (meer dan 15% van eigen lichaamsgewicht in 2 weken), verlaagde voedselinname of verminderde verzorging zal het dier meteen worden geëuthanaseerd (=humane eindpunt) waardoor ernstig ongerief wordt voorkomen.

Uitkomst parameters: spierzwakte (bepaald door motorische testen), gewichtsbepaling, ex-vivo onderzoek van de hersenen.

Referenties

1. [redacted]

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

De dieren worden intracranieel ingespoten met [redacted]. De [redacted] behandeling door het toedienen (oraal, sc of ip) van [redacted] hangt van de factoren die komen uit het onderzoek beschreven in bijlagen 1-3 of

ander onderzoek.
De dosis en de frequentie hangen en de toedieningsroute is afhankelijk van het [redacted] (geselecteerd uit bijlage 2 of de literatuur) met een wekelijkse behandeling met een duur van 2 – 11 maanden. Dit zal per werkprotocol met de IvD worden afgestemd.

Tabel 1: overzicht handelingen

A. handeling	B: Frequentie	C. duur
Intracraniale injectie	eenmalig	~10 min.
[redacted] behandeling, p.o. s.c of i.v., i.p.	1 x dag of 1 x week	Max 11 mnd
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
[redacted]	Max 4 maal	Max 10 min per test
Doden	1 maal	~1 min
[redacted] fenotype		~2-7 maanden

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

Door de multidisciplinaire aanpak van dit project kan met een minimale fok (en dus zo min mogelijk surplus dieren) het onderzoek worden uitgevoerd. Op basis van de experimenten beschreven in bijlagen 1 – 3 kan een goede keuze worden gemaakt voor het optimale model en de optimale keuze van [redacted]

Hoofd parameter is de histopathologie om aan te tonen dat de [redacted].
Verwachte uitkomst: Wij verwachten dat de [redacted] een verminderd fenotype [redacted] muis, aangezien eerdere studies in andere laboratoria hebben aangetoond dat [redacted] herstel kunnen geven in muismodellen [redacted].

Gebruik per jaar per lijn
Testen van [redacted]
[redacted] BL6 muizen:

- ⇨ Deze [redacted] muizen worden gebruikt omdat zij tijdens het leven geleidelijk aan een [redacted] fenotype gaan vertonen en zo de mogelijkheid geven om het effect van de behandeling te volgen.
- ⇨ Behandelde dieren worden op 3 leeftijden bestudeerd: ~2 maanden (pre-klinisch symptomatisch); ~5 maanden (klinisch symptomatisch); ~7-12 maanden (evident klinisch symptomatisch). Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- ⇨ 2 behandelgroepen: vehicle + compound, deze compounds zijn geselecteerd uit eerder onderzoek of nieuwe resultaten uit bijlage 1-3. De compound zal als zuivere stof in een [redacted] vehicle worden toegediend.
- ⇨ Het te isoleren materiaal voor verdere analyse dient verschillend verzameld te zijn: vers en na perfusie (onder anesthesie)
- ⇨ Berekening van aantal dieren:
  Gebaseerd op eerdere studies is de volgende Poweranalyse uitgevoerd:
  Control (saline): gemiddelde gevonden waarde 0.27 ([redacted])
  Gewenst effect na behandelding: ≤ 0.19, st.dev.: 0.05 en desired power: 0.8
- ⇨ 7 dieren per groep
- ⇨ Aantal dieren: 3 leeftijden x 2 behandelgroepen x 2 weefselgroepen x 7 dieren/groep= 84 dieren per experiment
- ⇨ Ivm met opvolgen van dieren achten we dat max 2 compounds per jaar getest kunnen worden: 84 x 2 = 168 dieren
- ⇨ Aantal interventies: 2 interventies per jaar en maximaal 10 interventies per 5 jaar.

Testen van [redacted] **in combinatie met** [redacted]**:**
[redacted]

- ⇨ Behandelde dieren worden met de volgende therapievormen behandeld: [redacted]
- ⇨ Berekening van aantal dieren:
  Gebaseerd op eerdere studies [redacted]) waarbij ook is gekeken naar verbeterd fenotype van muizen met een [redacted] na behandeling [redacted]
  - Poweranalyse ([redacted]):
    Control (saline): gemiddelde overleving (toepassen humaan eindpunt) is 135 dagen,
    Behandeld: gemiddelde overleving (toepassen humaan eindpunt) is 171 dagen
    St.dev.: 40, desired power: 0.8
- ⇨ 20 dieren per groep, maar omdat dat in de praktijk niet haalbaar is worden experimenten om praktische redenen sequentieel uitgevoerd op basis van nesten.
- ⇨ Aantal dieren: 3 leeftijden (~2 maanden, ~5 maanden, ~7-12 maanden) x 2 fixaties (vers, PFA) x 20 dieren per groep = 120 dieren
- ⇨ Om logistieke redenen worden er niet meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd. Maximaal aantal pups dat er per maand geïnjecteerd wordt: 8 (nestjes per maand) * 6 (± dieren per nestje) = 48 dieren
- ⇨ Voor iedere conditie (binnen 1 experiment) wordt 1 nestje gebruikt; het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. De resterende dieren worden verzameld voor biobanking.
- ⇨ Per jaar wordt er maximaal getest: 48 (dieren per maand) * 12 (maanden per jaar) = 576 pups
- ⇨ Berekening van aantal interventies per jaar: 576 pups / 120 (dieren per experiment) = 4,8
- ⇨ Aantal interventies: 4-5 interventies per jaar en 20-25 interventies per 5 jaar.

Genereren van celpopulaties:

<u>Genereren van [redacted]:</u>

C57BL/6J muizen:

- ⇨ De gezonde [redacted] worden uit E18 C57BL/6J pups geïsoleerd. Voor de isolatie van [redacted] worden zowel mannetjes als vrouwtjes gebruikt.
- ⇨ Onze experimenten hebben aangetoond dat we uit een E18 nestje (gemiddeld 6 pups) ~ $2,5 * 10^7$ [redacted] kunnen isoleren. Om genoeg [redacted] voor injectie van maximaal 12 dieren (op 1 dag) hebben we daarom naar verwachting 2 E18 nestjes of 12 C57BL/6J pups nodig.
- ⇨ In 1/3 deel van de experimenten per jaar worden gezonde muis [redacted] afkomstig van E18 embryo's toegediend.
- ⇨ Aantal dieren: 576 (pups per jaar) / 12 (dieren [redacted]) * 1/3 [redacted]) * 12 (pups) = 192 E18 pups per jaar.

<u>Genereren van [redacted]:</u>

[redacted] *BL6* muizen:

- ⇨ [redacted].
- ⇨ De parameters ([redacted]) worden op twee leeftijden: 2 maanden ([redacted]) en 4 maanden ([redacted]) geanalyseerd;
- ⇨ Voor iedere leeftijd injecteren we 3 dieren. Ondanks dat 1 [redacted] dier volstaat, houden we rekening met experimentele variatie: [redacted]
- ⇨ [redacted] voor de injectie van 30 dieren.
- ⇨ Per jaar worden maximaal 576 dieren getransplanteerd; 2/3 vd experimenten worden [redacted]. 576 * 2/3 / 30 = 12,8 [redacted] per jaar
- ⇨ Aantallen: 12,8 batches * 2 (leeftijden) * 3 (dieren/leeftijd) = 76,8 (77) dieren per jaar

B. De dieren

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

Diersoort: muis (Mus musculus) en genetisch gemodificeerde muizen.

Herkomst: alle dieren worden in het proefdiercentrum gefokt onder SPF condities.
De homozygote mutanten worden gegeneerd met de [redacted] fok.
Er worden [redacted] gebaseerd op resultaten uit bijlagen 1 – 3), [redacted] en WT C57BL/6J muizen gebruikt. Wanneer [redacted] worden [redacted] zullen [redacted] op een [redacted] achtergrond worden gebruikt omdat anders de [redacted].
De [redacted] mutaties zijn aanwezig in [redacted] en veroorzaken in muizen een vergelijkbaar klinisch ziektebeeld, [redacted].
C57BL/6J muizen worden gebruikt om [redacted].
[redacted] muizen worden gebruikt om de [redacted]
De behandeling van de [redacted] zal vanaf P0 starten. Het precieze tijdstip van [redacted] behandeling hangt deels af van de factoren die uit het onderzoek beschreven in bijlages 1-3 komen. De dieren vertonen pas vanaf 5 maanden klinische afwijkingen.
C57BL/6J muizen worden op E18 gebruikt omdat dan [redacted].
Alle pups in het nestje worden gebruikt, aangezien op E18-P0 de sexe lastig is te bepalen.

Tabel 2: Aantallen en levenstadia

Aantallen en levenstadia per jaar:

Diersoort	**Muis**	**Muis**	**Muis**	**Muis**
Aantal	168	576	192 + 32 moeders	77
Stam	[redacted] *BL6*	[redacted] RAG2null *BL6*	*C57BL/6J*	[redacted] *BL6*
Geslacht	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen	Mannen/vrouwen
Leeftijden (maanden)	~2 m, 5 m, 7-12 m	~2 m, 5 m, 7-12 m	E18, ~8 tot 20 weken voor moeders	~2 m, 4 m

- Drachtige muizen waarvan de pups (beide sexen) op E18 onder terminale anesthesie en hysterectomie worden geboren.
- De genereerde nestjes worden geïnjecteerd met [redacted] afkomstig van 1) geïsoleerd uit E18 C57BL/6J pups, 2) gegenereerd via [redacted] of 3) gegenereerd [redacted].
- Per experiment worden de muizen na 2 maanden (pre-klinisch symptomatisch), 5 maanden (start klinisch symptomatisch) of 12 maanden (evident klinisch symptomatisch) geëuthanaseerd. Wanneer evidente klinische symptomen zouden overgaan in ernstigere klinische symptomen (=humaan eindpunt), zullen de dieren worden getermineerd, zodat het ongerief maximaal matig blijft.
- Het toepassen van meerdere condities binnen 1 nestje is praktisch niet haalbaar. Wanneer niet alle dieren nodig zijn, worden de resterende dieren verzameld voor biobanking.
- Experimentele variaties kunnen ontstaan doordat [redacted] Met deze variaties is al rekening gehouden in de bovenstaande berekeningen van aantallen.
- Om logistieke redenen is het niet realistisch dat er meer dan 2 nestjes per week getransplanteerd worden.

Totaal aantal dieren: 1045 x 5 jaar = 5225 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:
Het is bij patiënten relatief gemakkelijk om aan bloed te komen. Om deze reden hebben wij primair veel onderzoek gedaan aan lymfoblasten (gekweekte witteblоedcellen) van [redacted] patiënten. Wij hebben gevonden dat dit celtype geen belangrijke nadelige gevolgen ondervindt van het genetische defect. Vergelijkbare resultaten zijn verkregen met fibroblasten van patiënten (gekweekte huidcellen). Derhalve zijn beide celtypes helaas ongeschikt voor verder onderzoek naar ziektemechanismen. [redacted] is een hersenziekte en wij hebben geen toegang tot hersencellen van [redacted] patiënten tijdens het leven. Onderzoek van hersencellen is onmisbaar om inzicht in ziektemechanismen te krijgen. Daarnaast kunnen wij niet vrijelijk therapeutica uitproberen bij levende patiënten. Het enige dat wij voor patiënten kunnen doen is uitlokkende factoren vermijden (mn. koorts); de praktijk heeft geleerd dat dergelijke maatregelen volstrekt onvoldoende zijn en de ziekte desondanks doorgaat. Onderzoek in proefdieren is onmisbaar om een therapie uit te ontwikkelen.

Vermindering:
Indien logistiek haalbaar zullen we experimenten zo veel mogelijk combineren door bepaalde controle groepen te delen bij de analyse van de data. Van het uitgenomen materiaal (hersenen) wordt alles gebruikt voor verdere ex-vivo analyse. De groepsgrootte is statistisch bepaald.

Verfijning:
Er wordt op basis van de resultaten uit bijlage 1 – 3 een model gekozen met milde ziekte kenmerken.
Weliswaar duren de experimenten dan langer voordat effecten kunnen worden waargenomen, maar wordt matig tot ernstig lijden voorkomen.
Daar het verloop van de ziekte ons bekend is wordt tijdig voer op de bodem van de kooi gelegd en worden de experimenten beëindigd op het moment dat we effecten op [redacted] (histopathologie) mogen verwachten. Door de [redacted] aanpak beschreven in de 4 bijlagen kan een zeer efficiënte fok worden opgezet en worden grote aantallen surplus dieren van niet-gewenste genotypes voorkomen.

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

Er is gekozen voor een mild model, er wordt op tijd zacht voer onder in de kooi gelegd. In de groep waar effecten na > 5 maanden geëvalueerd gaan worden, kunnen ernstiger symptomen van [redacted] worden waargenomen (zoals > 15% gewichtsverlies, ernstige neurologische symptomen zoals verlamming) zal een humaan eindpunt worden toegepast. Er wordt samen met de IvD een score tabel opgesteld voor een humaan eindpunt waardoor ernstig ongerief voorkomen kan worden. De genetisch gemodificeerde dieren, hun controles en het gebruikte beddingmateriaal wordt conform de wet verbrand zodat niets in het milieu terecht kan komen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze experimenten zijn niet eerder uitgevoerd; deze studies betreffen een nieuwe onderzoekslijn

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☐ Nee

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

De dieren worden zoveel mogelijk sociaal gehuisvest. De mannetjes worden indien nodig solitair gehuisvest, omdat bekend is dat deze kunnen vechten bij groepshuisvesting.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Het moederdier zal onder terminale anesthesie een hysterectomie ondergaan.
Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk ([redacted] zullen onder hypothermie worden uitgevoerd. Pups worden na de behandeling bij fostermoeders gelegd.

☐ 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?

Kenmerken van wittestofziekte in muizen: naar buiten draaien van achterpoten (ataxie) met als gevolg moeilijk oprichten op de achterpoten (reiken naar voer en water); gewichtsafname.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het verdwijnen van de witte stof uit de hersenen in de dieren.

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

Uit de bestaande genetisch gemodificeerde muizen wordt een mild model gekozen en wordt er zacht voer op de bodem van de kooi gelegd. De uitgevoerde behandelingen [redacted]) gebeurt onder pijnbestrijding. Anesthesie is bij hele jonge pups niet mogelijk ([redacted]), daarom wordt hypothermie gebruikt door de pups in met ijs gekoelde (klei vervaardigde) mallen te plaatsen. Direct contact met ijs wordt vermeden om bevriezing van de huid te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In overleg met de IvD zal voordat met een experiment wordt gestart een score lijst worden opgesteld gebaseerd op de hierna genoemde criteria voor het uitvoeren van een humaan eindpunt (som van gewichtsverlies, verminderde vachtverzorging en afname van motorische functies). HEP is als volgt gedefinieerd: 15% gewicht verlies over enkele dagen tot maximaal 1 week of 20% vanaf het zwaarste punt tot maximaal 2 dagen of ernstige neurologische symptomen zoals verlamming of tonusverlies.

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

10%

K. Classificatie van ongerief

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

Matig door de intracraniele behandeling onder hypothermie, licht indien een behandeling effectief lijkt te zijn, matig indien een humaan eindpunt moet worden toegepast. Er worden geen complicaties verwacht van [redacted] doordat deze zuiver zijn en goed opgelost worden toegediend. Het is dus niet te verwachten (op basis van literatuur gegevens) dat de te onderzoeken [redacted] ongerief veroorzaken.

Tabel 3: ongerief per handeling

A. handeling	**B. kwalificatie** *terminaal/licht/matig/ernstig*	**C. duur v.h. ongerief**
Uithalen van baarmoeder	Terminaal	~2 min
[redacted]	Matig (onder hypothermie bij jonge pups)	~ 10 min
[redacted] behandeling, p.o. s.c of i.v., i.p.	Matig	~ 30 sec (dagelijks tot wekelijks)
[redacted]	Licht	~4x 10 min
[redacted]	Licht	~4x 10 min
[redacted]	Licht	~4x 10 min
Doden	Licht of terminaal (perfusie of onder anesthesie moederdieren)	~ 1 min
[redacted] fenotype	Max. Matig	~2-7 maanden

Het cumulatieve ongerief is ‘matig’ bij ~79% van de dieren.
Het cumulatieve ongerief is ‘licht’ bij ~18% van de dieren.
Het cumulatieve ongerief is ‘terminaal’ bij ~3% van de dieren (zie Tab. 1).

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.

Weefseluitname (hersenen) voor verdere ex-vivo analyse.

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

17.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[redacted]20172804

Bijlagen
1

Datum 19 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 31 juli 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project '[redacted] kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën" met aanvraagnummer AVD1140020172804. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij u vragen gesteld over de mobiliteitstesten, het niet toepassen van pijnbestrijding, de individuele huisvesting, het ongerief, het benodigd aantal dieren en de humane eindpunten. Met uw antwoord heeft u nieuwe documenten meegestuurd. 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.
In uw aanvraag geeft u aan verschillende mobiliteitstesten zoals grip strength measure, balance beam and foot print test uit te voeren. U laat in uw aanvraag ruimte over voor het uitvoeren van andere mobiliteitstesten. Er mogen echter geen handelingen worden uitgevoerd die niet in de aanvraag staan beschreven. Om deze reden hebben wij een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd.

U kunt met uw project '[redacted] in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën" 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 niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC [redacted] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 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]

Algemeen ~~Secretaris~~

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

Datum:
19 september 2017
Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: [redacted]

Adres:
Postcode en plaats:
Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project [redacted] in kinderhersenen: pathogenese en potentiële interventie therapieën" met aanvraagnummer [redacted] 20172804, volgens advies van Dierexperimentencommissie [redacted] Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 juli 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 juli 2017, ontvangen op 31 juli 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 augustus 2017

Aanvraagnummer:
AVD1140020172804

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Behandeling van [redacted] in muizen met [redacted] gericht op o.a verbeterde [redacted]				
	Muizen (Mus musculus) /	592	100% Matig	
3.4.4.2. Behandeling van [redacted] in muizen door [redacted] [redacted] routes				
	Muizen (Mus musculus) /	3.080	80% Matig 20% Licht	
3.4.4.3. Verbetering van [redacted] ex-vivo analyses na [redacted] uit muizen met [redacted] in celkweek				Totaal aantal dieren: 3185. Aantal embryo's (E18): 32
	Muizen (Mus musculus) /	3.185	26% Matig 74% Licht	
3.4.4.4. Behandeling van [redacted] n muizen met [redacted]				Totaal aantal dieren: 5225. Aantal embryo's (E18):960
	Muizen (Mus musculus) /	5.225	3% Terminaal 79% Matig 18% Licht	

Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

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.

Er mogen geen andere dan de drie in de aanvraag genoemde mobiliteitstesten worden uitgevoerd.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
[redacted]20172804

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.

2885

Centrale Commissie Dierproeven

1.

0 9 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* 10700

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	50169181

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	Minderbroedersberg	4-6
Postbus	616	
Postcode en plaats	6200 MD	MAASTRICHT
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	

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		☐ 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	[redacted]
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		☒ Nee	

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 9 - 2017
		Einddatum	1 - 9 - 2020
3.2	Wat is de titel van het project?	Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC UM
		Postadres	POSTBUS 616 6200 MD MAASTRICHT
		E-mailadres	secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

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

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	MAASTRICHT UNIVERSITY
1.3	Provide the title of the project.	Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation

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.

Carotid artery stenosis, as a result of hypertension, dyslipidemia, diabetes as well as ageing, interferes with the cerebral autoregulation and leads to cerebral hypoperfusion. This is considered as a major trigger for the development of vascular cognitive impairment (VCI)[1]. Following the induction of

carotid artery stenosis in mice, their cognitive function is selectively impaired over time (working memory altered first, followed by impairment of short/long-term memories at a chronic timepoint)[2,3]. However the different key players involved in this pathological cascade and their involvement in a time-dependent manner remain elusive. We showed that microglia cells are involved in the pathological cascade of hypertension-induced VCI[4]. Indeed, leakages of the blood brain barrier (BBB), due to the elevated blood pressure, are associated with an increased density and activation of microglia.

Microglia are the resident immune cells of the brain and protect it from neurodegeneration. Brain injury, including cerebrovascular injuries[5], leads to morphological changes, migration and proliferation of microglial cells at the site of injury. In addition to the phagocytosis of dead cells and debris, activated microglia also release cytokines to maintain local homeostasis, and therefore protect neuronal function. This protective phenotype is believed to take place in an acute manner. However upon exposure to chronic pathological conditions, microglial activation is associated with neurotoxic functions and the emergence of an aberrant inflammatory response (increased synthesis of cytokines: a.o. IL-1β, TNF-α, IL-6[6]) a phenomenon leading to neurodegeneration[7].

Although their ability to activate upon hypoxic conditions has been proven in vitro[8], there is no direct in vivo evidence linking tissue hypoperfusion to microglial activation. Furthermore the subsequent consequences of microglial activation on cerebrovascular (BBB) and neuronal integrities is unknown. It is therefore of utmost importance to study their activity in vivo over time (upon acute and chronic hypoperfusion).

In addition to microglia, other immune cells may play a role in Vascular Cognitive Impariment pathologies following BBB injury. The contribution of other immune cells in this pathological condition will be studied in case findings regarding the impact of microglia in this pathology is limited.

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?

Overall objective:
The aim of the present study is to decipher the pathological cascade associated with cerebral hypoperfusion. In particular the present project will investigate the role of microglia cells on the vascular and neuronal compartments during cerebral hypoperfusion.

Aim 1: Pathological cascade of cerebral hypoperfusion
Determine if acute and chronic cerebral hypoperfusion are associated with Blood Brain Barrier leakages, microglial activation, neurodegeneration and cognitive impairment.

Aim 2: Modulation of microglial activity/presence during cerebral hypoperfusion
Determine if microglia cells exhibit a protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion by modulating their function and/or density in the brain.

Achievability:
This research project is achievable within a reasonable time frame (3 years) and with a limited number of animals. Most of the techniques, including the thinned skull cranial window, required to perform this project are already present within the research group. The involved researchers have a long-standing experience with the main procedures described in this project: carotid surgery, cerebral blood flow measurement, cranial window, in vivo imaging, behavioural tasks and animal perfusion. In addition, the implementation of BCAS surgery, which is a similar surgery that one already mastered on site (placement of a carotid cuff), will be taught by external researchers experts in this technique (national collaboration).

3.3 Relevance

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

Cognitive impairment and dementia, are major disabilities increasing due to population ageing. The World Health Organization estimates that 35 million people live with dementia and expects this number to triple by 2050[9]. Major progresses in the last decade have revealed the contribution of vascular dysfunction to cognitive impairment[10], but the extent of this contribution to all cognitive impairment/dementia cases is still unclear as tools/biomarkers to detect small vessel disease pathology in the brain have been only validated recently. Vascular Cognitive Impairment (VCI) encompasses all the cognitive disorders associated with cerebrovascular disease, from frank dementia to mild cognitive deficits[1]. The present project is therefore of major importance to improve our understanding of the pathology and to identify potential therapeutic target to limit/delay its progression.

3.4 Research strategy

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

3.4.1 – Project design

Project description

Animals and surgery

Transgenic reporter mice expressing Green Fluorescent Protein (GFP) in microglia (Cx3Cr1-GFP) and Yellow Fluorescent Protein (YFP) in neurons (Thy1-YFP) will undergo a thinned-skull cranial window surgery followed by a Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS) procedure to induce cerebral hypoperfusion (or sham operation)[11,3]. Two-photon imaging of the cerebral cortex through the thinned-skull cranial window will allow the study over time of the vascular, microglial and neuronal compartments.

Cerebral blood flow, in vivo imaging and cognitive function (Aim 1 & 2)

At all timepoints, the cerebral blood flow will be measured using a trans-cranial laser Doppler flowmeter.
In vivo imaging (via the cranial window) will be performed before the BCAS surgery, few days after (acute timepoint) and up to one month after the surgery (chronic timepoint), in order to assess the activity/phenotype of microglia over time. The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery (acute and chronic). Investigations of the cognitive function at both (acute anc chronic) timepoints is needed as it has been suggested that working and short-term memories may be impaired at an earlier timepoint than long-term/reference memory in this model[3]. Working memory will be assessed with the use of a Y-maze alternation task, short-term and long-term memory with an Object Location task and spatial learning and long-term memory with the Barnes maze task. Brains from sham and BCAS reporter mice will be harvested for further investigations of microglial phenotype by flow cytometry and for 3D histology[12].

Treatment (Aim 2)

A pharmacological intervention to modulate the activation of microglia or to decrease their density will be performed in sham and BCAS mice. Targeting microglia in BCAS animals will allow us to decipher their protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion. One possible approach (amongst others) to investigate the role of microglia is to use a therapeutic intervention to deplete the microglial population via inhibiting CSF1 receptor signaling. This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals[13,14]. The definite treatment choice will be made at the end of other ongoing animal studies (not the proposed project) in which safety and efficacy will be assessed. The choice will be made during the preparation of the work protocol.

Experimental design

1) Pilot study

A pilot study will be performed to implement the BCAS surgery and to validate the readouts for in vivo imaging in this animal model before the study of the experimental groups.
A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be tested in combination with the cranial window surgery.

In this pilot study both Sham and BCAS groups are required.
The Sham group is of importance for the pilot study for the following reasons:
- Statistical validation of the decrease of the cerebral blood flow (laser Doppler). Sham and BCAS groups should be balanced (similar n) for a proper validation;

- the pilot study is not only required to learn the BCAS surgery but also to assess its feasibility in combination with the cranial window surgery and imaging. It is of major importance to demonstrate the BBB integrity in the Sham animals over time to be able to assess the BBB dysfunction in the BCAS mice.

The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :

- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that corresponds to the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

20 mice per group (Sham/BCAS) are planned for the pilot study. However a soon as the threshold of 10 successful experiments (BCAS + cranial window + imaging) will be reached per group (with the above-mentioned criteria), no additional animals will be used for the pilot project and the study of the experimental groups will be initiated.

2) Acute and chronic BCAS to evaluate the pathological cascade and effects of microglia modulation as defined in aims 1 and 2

A phased design between the acute and chronic timepoints is not possible within this project. Indeed, while acute hypoperfusion can lead to a decline in the working memory, short and long-term memory impairment can only be detected after a longer exposure to hypoxic conditions[3,2]. It is therefore mandatory to study both timepoints as the brain areas targeted by acute and chronic hypoperfusion can differ (in relation to the type of memory dysfunction). In addition, it is known that microglial behaviour can differ between acute and chronic stimuli, harbouring respectively either a protective or a deleterious phenotype. Their study over time is therefore also required.

The different steps of the project and their logical sequence are shown in Figure 1 (below, next page).

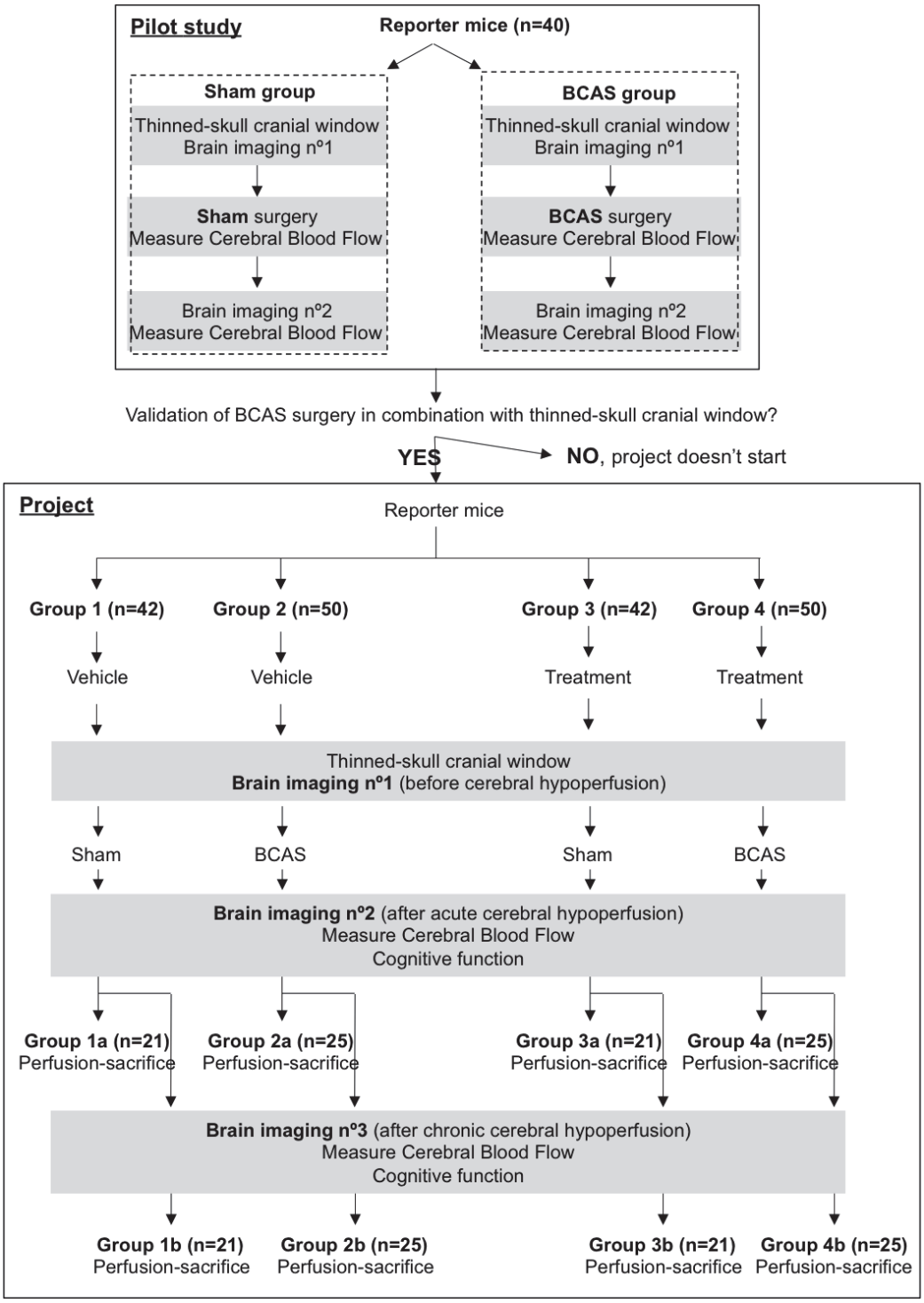


Figure 1: Overall design of the project

References:

1. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* **80,** 844–866 (2013).
2. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38,** 2826–2832 (2007).
3. Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41,** 1278–1284 (2010).

[redacted]

5. Nishimura, N. & Schaffer, C. B. Big effects from tiny vessels: imaging the impact of microvascular clots and hemorrhages on the brain. *Stroke* **44,** S90–92 (2013).
6. Perry, V. H. & Holmes, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **10,** 217–224 (2014).
7. Luo, X.-G., Ding, J.-Q. & Chen, S.-D. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **5,** 12 (2010).
8. Li, F. *et al.* Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* **12,** 111 (2011).
9. World Health Organization & Alzheimer's Disease International. *WHO | Dementia: a public health priority*. (2012).
10. Gorelick, P. B. *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* **42,** 2672–2713 (2011).
11. Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35,** 2598–2603 (2004).
12. Pan, C. *et al.* Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* **13,** 859–867 (2016).
13. Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82,** 380–397 (2014).
14. Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12,** 139 (2015).
15. Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34,** 319–337 (2013).

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.

3.4.2 – Procedures

Listing of the procedures:
- Handling and weighting the animals;
- Sham or BCAS surgery;
- vehicle or drug treatment;
- cerebral blood flow measurements using a laser-doppler flowmeter;
- thinned skull cranial window;
- in vivo 2-photon imaging;
- behavioural tasks (Y-maze alternation task, Objection Location task, Barnes Maze test);
- perfusion +/- fixation for histology and flow cytometry.

In vivo/Ex vivo imaging:
The thinned skull cranial window performed on transgenic reporter mice that will express fluorescent probes in microglia and neurons (Cx3Cr1-GFP x Thy1-YFP) will allow the study of the vascular, microglial and neuronal compartments over time as follow:
- The cortical vasculature will be visualized after the injection of a chemical dye which should not leaked from the lumen to the brain parenchyma due to its size. The presence of the dye outside of the vasculature will indicate a dysfunction of the blood brain barrier. Leakages will be imaged and quantified;
- Microglia behaviour: density and morphology such as cell volume, length of microglial processes, distance from vessel/leakage;
- Neuronal integrity: axonal degeneration.
Ex vivo imaging of the isolated brains will allow further investigations within the whole brains using 3D histology (acute and chronic timepoints).

Behavioural tasks:
A set of behavioural tasks will be performed after the sham/BCAS surgeries (acute and chronic timepoints):
- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task[15];
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location

Task[15];
- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test[3] (only chronic timepoint).

Sacrifice:
Sham and BCAS mice will be sacrificed at both acute and chronic timepoints for brain extraction, microglia isolation and flow cytometry work. Using microglial/macrophage specific markers, the phenotype of microglia cells will be characterized and compared between groups.

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.

3.4.3 Planning – coherence

The steps of the project are shown in Figure 1.
- The first cranial window in vivo imaging session will be done before the induction of hypoperfusion or sham procedures in order to collect baseline data for later comparison with the next timepoints;
- The treatment (or vehicle) to interfere with microglial function/presence will be performed before the induction of hypoperfusion as well to be able to understand the impact of microglia at both acute and chronic timepoints of hypoperfusion;
- The cerebral blood flow (laser Doppler) will be assessed at the baseline before induction of hypoperfusion, right after the surgery to guarantee the efficiency of the surgical procedure, and at each timepoint of the study:
- Acute timepoint: few days after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;
- Chronic timepoint: approximately 1 month after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;

Coherence
After induction of cerebral hypoperfusion, the integrity of the BBB is expected to be altered, leading to leakages of blood components/cells to brain parenchyma. Subsequently microglia will become activated to phagocyte the components that invade the brain. This acute hypoperfusion combined with acute microglial activation is expected to have a limited impact (as for amplitude and localization) on neuronal viability/function, with a cognitive dysfunction limited to working memory. However, following a chronic hypoperfusion, the BBB damage is expected to be more extended and associated with a deleterious microglial phenotype with exaggerated pro-inflammatory actions. As a consequence, neuronal injuries may take place in multiple cognitive domains leading to subsequent deficits in short and long-term memory tasks. By modulating microglial density and/or activity in the treated groups, the pro-inflammatory profile due to microglia is expected to decrease, affording therefore neuroprotection and a maintained cognitive function in this disease model.
Although cranial window imaging technique offers temporal resolution, it is limited to cortical areas. Therefore immunohistochemitry studies at both acute and chronic timepoints will be performed on whole brains to further investigate the brain pathological changes in deeper areas. Furthermore flow cytometry of brain tissues will offer complementary phenotypic informations (markers of activation) on microglial populations at both timepoints.

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	Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging
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	Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie
1.2	Looptijd van het project	3 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Dementie; cerebrale hypoxie; carotisstenose; neuro-inflammatie; in vivo beeldvorming

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)

Risicofactoren voor hart- en vaatziekten (zoals hoge bloeddruk, diabetes, verhoogd cholesterol) en veroudering kunnen leiden tot een afname van de diameter van de carotis, het bloedvat dat verantwoordelijk is voor de toevoer van zuurstofrijk bloed naar de hersenen. Het kleiner worden van de carotis wordt een carotisstenose genoemd en wordt geassocieerd met een verminderde bloedstroom in de hersenen, geheugenverlies en dementie.

Geheugenverlies en dementie zijn grote beperkingen die vaker voorkomen door veroudering van de bevolking. Er is (nog) geen adequate behandeling voorhanden. Het is daarom van groot belang om het onderliggende ziektemechanisme beter te begrijpen. De rol die microgliacellen, de immuuncellen van de hersenen, hierbij spelen is nog onbekend. Er is bij

		eerdere studies bewijs gevonden dat deze cellen beschadigd raken wanneer ze blootgesteld worden aan te weinig zuurstof. Daarom zal dit project de rol van microgliacellen bij een carotisstenose onderzoeken.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	We verwachten te bepalen of microgliacellen een beschermende of een schadelijke invloed hebben op de bloedvaten en zenuwcellen in de hersenen bij een verminderde bloedtoevoer naar de hersenen. Verdere kennis over de rol van microgliacellen in deze ziekte zullen leiden tot nieuwe studies die de werking van microgliacellen zullen remmen danwel bevorderen. Vanuit dit project kunnen hopelijk toekomstige behandelmogelijkheden ontstaan die zich richten op microgliacellen.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor de studie worden maximaal 224 muizen gebruikt over een periode van 3 jaar.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	In dit project wordt gebruikt gemaakt van genetisch gemodificeerde dieren. Deze dieren heb een verandering in de genen ondergaan waardoor er fluorescentie tot uiting komt in de cellen van interesse. We hebben deze muizen in eerdere studies onderzocht en er wordt geen ongerief verwacht ten aanzien van dit fluorescentie kenmerk. De muizen in de studie zullen operaties ondergaan. Deze operaties worden uitgevoerd onder anesthesie waardoor er geen directe negatieve effecten worden verwacht door de operatie. De consequenties van de operaties zullen echter leiden tot ongerief voor de geopereerde muis door verminderde bloedtoevoer naar de hersenen. Dit gaat gepaard met gewichtsverlies en stoornissen in het geheugen, zoals verwacht bij het ontwikkelen van de ziekte. Eén deel van de dieren zal ook behandeld worden met een geneesmiddel om het aantal microgliacellen te verminderen terwijl de andere groepen een placebo behandeling krijgen. Het geneesmiddel wordt op dit moment getest in mensen en is eerder al getest in verschillende dierstudies waarbij er geen ongerief voor de dieren wordt gerapporteerd.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	De operaties worden ingedeeld in de categorie "matig ongerief ". De gevolgen van de operaties worden ingedeeld in de categorie "matig ongerief".
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Euthanasie

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	Onze studie is gericht op de interactie tussen verschillende cellen bij verminderde bloedtoevoer naar de hersenen en de invloed van het toedienen van een geneesmiddel tijdens de ontwikkeling van een ziekte. Er is geen alternatieve methode voor deze studie. Daarnaast worden ook de geheugenfuncties geëvalueerd om het potentiële effect van de behandeling te beoordelen.

	gebruikt kunnen worden.	
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Hetzelfde dier wordt gebruikt voor het onderzoeken van verschillende parameters tijdens dit project. Er worden immers een aantal experimenten uitgevoerd op hetzelfde dier: geheugen taken, beeldvorming, bloedafname en analyse van de hersencellen. Het aantal dieren nodig per groep wordt berekend op basis van eerdere studies en bestaande publicaties om te garanderen dat het juiste aantal dieren (niet te veel, niet te weinig) wordt gebruikt.
4.3	**Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.	De muizen die we gaan gebruiken in dit onderzoek zijn transgene dieren die een fluorescerend eiwit in de cellen van interesse hebben. Dit maakt het mogelijk de cellen in levende muizen te volgen en dit geeft meer informatie dan de standaard beeldvormende technieken. De muizen ondergaan een erkende chirurgische ingreep die verminderde bloedtoevoer naar de hersenen veroorzaakt. Dit is een erkend model in dit onderzoeksveld. De combinatie van deze chirurgische operatie en de transgene muis is een perfecte combinatie voor het bereiken van de doelen van het voorgestelde onderzoek.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	De kans op lijden of pijn wordt tot een minimum beperkt door een combinatie van verdoving, pijnbestrijding, optimale huisvesting, termineren van dieren in aparte ruimten en het wekelijks inspecteren van het welzijn van de dieren.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

Centrale Commissie Dierproeven

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.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'.	10700
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	MAASTRICHT UNIVERSITY
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging

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 type and sequence of the animal procedures is summarized in the figure 1 and listed below.
Ten animal groups will undergo these procedures (Pilot Sham, Pilot BCAS, group 1a, group 1b, group 2a, group 2b, group 3a, group 3b, group 4a, group 4b):

Groups	Pilot		1 (a&b)	2 (a&b)	3 (a&b)	4 (a&b)
Goal	Optimization		Experimental groups			
Surgery	Sham	BCAS	Sham	BCAS	Sham	BCAS
Treatment	No		Vehicle	Vehicle	Treatment	Treatment
Timepoints	Acute & chronic		Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)

Only male mice will be studied as sex differences have been reported for microglial activation [1–3] but also cognitive impairment disorders[4]. Sex-specific differences in gene expression have been observed in resting microglia that may lead to a dfferential response upon exposure to a trigger. This has been confirmed in studies showing a differential microglial activation during stress and hypoxic conditions[1–3]. It is therefore very likely that the microglial response to BCAS may differ between genders. Because the inclusion of both genders may increase the variability, thus decrease the statistical power and limit the interpretation of the data, only male mice will be included in this study.

List of animal procedures:

Drug treatment

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The reporter mice will be treated with a drug either to deplete microglia cells or to decrease their activation. One possible therapeutic intervention is the depletion of microglial population via inhibiting CSF1 receptors (e.g. PLX5622). This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals[5,6]. The dose of the treatment will be selected based on published animal studies that have shown evidences for its efficiency and its toxicological safety. It will be administered throughout the whole study period (in food pellets or drinking water) to investigate the contribution of microglia cells to hypoperfusion-induced vascular dementia.

Cranial window surgery and imaging

The reporter mice will undergo a thinned-skull cranial window surgery.

This minimaly invasive procedure consists of the thinning of the skull in a small area to allow the vizualisation of vessels, microglia and neurons below the skull surface, without opening of the cranial box thanks to two-photon microscopy.

This technique will allow the chronic imaging of:

- the cerebrovascular permeability (permeability to injected fluorescent probes);
- the microglial behaviour (density, cell volume, location);
- the neuronal integrity (axonal integrity of cortical neurons).

In vivo brain imaging sessions will be performed before the induction of cerebral hypoperfusion, soon after the induction of hypoperfusion (1-3 days) and after a longer period (c.a. 4-5 weeks). This will give new insights into the pathology development over time.

Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS)

This well-established procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced with 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm[7,8].

Cerebral Blood Flow (CBF) measurements

The efficacy of the BCAS procedure will be assessed by the measurement of the CBF before the narrowing of the CCAs, right after the surgical procedure as well as at several time points throughout the studies to follow the severity of the hypoperfusion in each individual animal. CBF measurements will be achieved by using a trans-cranial laser Doppler flowmeter. The laser-doppler probe will be glued on the skull surface for a short time period allowing recording of the CBF.

Cognitive evaluation

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery at both acute and chronic timepoints.

- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task[9];
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location Task[9];
- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test[8] (only chronic timepoint).

Hypoperfused animals show an impaired working memory after cerebral hypoperfusion for 1 month while reference memory is only impaired after cerebral hypoperfusion for 5-6 months[7,8]. The protective or deleterious contribution of microglia cells on the cognitive functions of the animals will be determined in the treated groups.

Perfusion and sacrifice

Treated and non-treated sham/BCAS animals will be perfused and euthanized for the collection of brains that will serve for ex vivo investigations (2D and 3D histology, flow cytometry for the characterization of microglia phenotypes). While in vivo imaging limis the imaging to the first cortical layers of the brain, ex vivo imaging of the whole brains will provide more informations on the impact of cerebral hypoperfusion in deeper areas.

A first series of animals will be perfused and sacrificed at an early timepoint after induction of cerebral hypoperfusion. A second series of animals - imaged in vivo at both acute and chronic timepoints - will be perfused and sacrificed at the late timepoint after in vivo imaging. During the perfusion step, several fluorescent dyes will be injected to assess the integrity of the blood brain barrier.

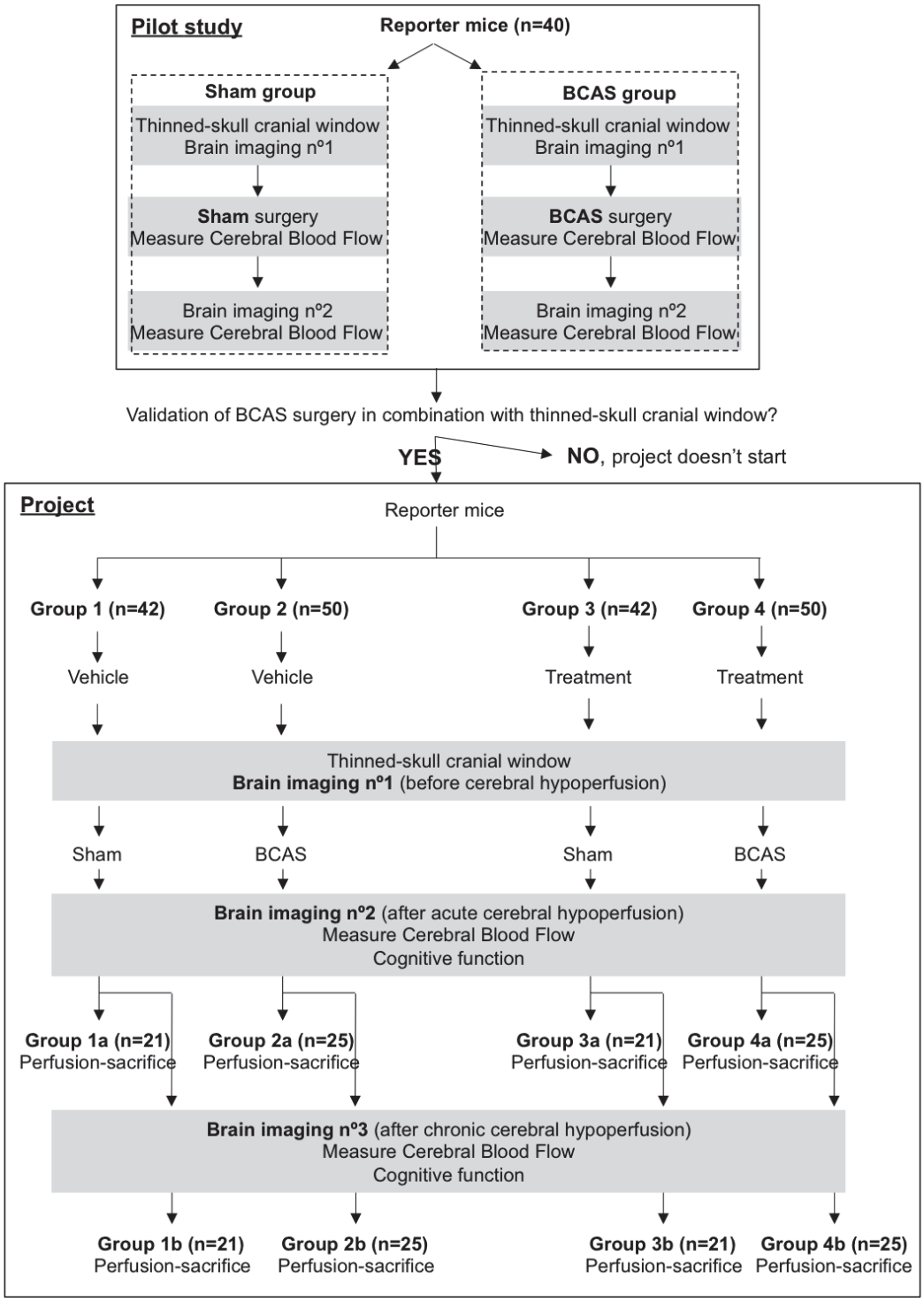


Figure 1: General design of the experimental procedures

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

Total duration

Maximal experiment duration for one animal (chronic hypoperfusion situation): 6 weeks (one week with cranial window prior BCAS surgery, maximum 5 weeks after BCAS surgery).

Animal procedures

All the animal procedures with their respective natures and frequencies are listed in the table below. A short description of the main procedures is described in the table below

Procedure	Nature	Frequency	Justification
Body weight measurement and neurological scoring	Animal handling	1x/week	Animal welfare score sheet and humane endpoint
Drug treatment (see corresponding paragraph, e.g. CSF1R inhibitor[5,6])	Administration of a drug (food or water)	daily	Study the potential protection afforded by the drug
Thinned skull cranial window and TPLSM imaging (see description below the table)	Surgery Imaging	1x 4x	In vivo imaging to study the impact of cerebral hypoperfusion on vascular, microglial and neuronal compartments over time [10]
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Surgery	1x	Induction of the pathology (cerebral hypoperfusion) [7,8]
Brain Laser Doppler flowmetry	Imaging	4 x	Assessment of the decrease of cerebral blod flow induced by the BCAS intervention, after surgery and prior to each imaging session. [7]
Y-maze alternation task	Behavioral task	2 x	Assessment of working memory[9,11]
Object Location Task	Behavioral task	2 x 3 trials	Assessment of short and long term spatial memories[9,11]
Barnes Maze test	Behavioral task	4 trials x 5 days	Barnes Maze test[8]
Perfusion and sacrifice	Terminal experimentation	1x	Collection of fixed and non-fixed brains for IHC and flow cytometry respectively

Thinned skull cranial window:

Transcranial two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) imaging of the cortex in living mice is a minimally invasive method, which allows repeated imaging of brain cells and vasculature at high optical resolution over intervals ranging from seconds to months. By creating a thinned-skull cranial window with skull thickness ~20 µm, it is possible to image fluorescently labelled structures located up to 300µm within the cortex using TPLSM. In the past several years, this transcranial imaging approach has been used to study the development and plasticity of synaptic connections, neuronal network activity, cerebral vasculature, amyloid plaques and the structure and function of microglial cells in the living intact cortex [10,12,13]. This is the most suitable technique for chronic in vivo imaging at a high resolution.

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)
Under surgical anaesthesia, a midline cervical incision will be performed. Both CCAs will be exposed and freed from their sheaths. The arteries will be gently lifted by sutures and placed between the loops of the microcoils just below the carotid bifurcation. The microcoils will be twined by rotating it around the CCAs. In the sham operation groups, CCAs will be exposed without placing microcoils. This technique has been proven to be effective to induce a moderate reduction of CBF (-30%) with a mortality of 15-20% and a cognitive dysfunction in the operated mice[7,8,14,15].

Y-maze alternation task
Each mouse will be placed in a randomly divided start arm of a Y-maze and allowed to freely explore the arena for 6 min. The number of arm entries and the locomotor activity will be recorded per mouse. A successful alternation, named « a triad », is made if the mouse visits all 3 arms of the maze consecutively. The alternation percentage will be calculated from the number of triads divided by the maximum possible alternations per mouse. This is a standard behavioural task to assess the working memory of rodents.

Object Location Task (OLT)
Short and long-term spatial memory will be tested using the OLT. Briefly, this 2-trial task consists of a learning (T1) and -test trial (T2). In T1 a set of two identical objects will be placed symmetrically in the middle of a circular arena, which can be freely explored for 4 minutes. After a short or long interval period spent in their home cage, the mice will be placed in the arena 4 minutes for T2, while one of the objects (right or left) will be moved to a different location (front or back) and all other stimuli will be kept the same. As rodents are naturally curious, they should spend more time exploring the moved object if they remember the previous location. The time spent exploring either object will be scored. Before the testing session, animals will be habituated to the empty arena, all objects and testing procedures for a period of 1 week. This is a standard behavioural task for the evaluation of both short and long-term spatial memories.

Barnes Maze test
This behavioral task assess the spatial learning and reference memory of the tested mice. It is based on the capabilities of mice to explore and escape through holes. Barnes maze consisted of a circular surface with many holes around the perimeter. An escape tunnel is located beneath one of the holes. After habituation to the experimental setup, mice will be trained to locate a hidden escape tunnel with the aid of visual cues. Mice will perform 4 trials per day for 5 consecutive days. The Barnes maze is similar to the Morris water navigation task, but does not utilize a strong aversive stimulus as reinforcement (stress induced by swimming). Since high levels of stress can influence the animal's performance, the Barnes maze is considered ideal for eliminating stress-induced confounds.

Perfusion and sacrifice
The following procedures will be applied depending on the animal serie:
- serie of animals for immunohistochemistry: under terminal anaesthesia, the animals will receive an i.v. perfusion of fluorescent probes to label the vasculature and assess the blood brain barrier permeability. After termination of the i.v. perfusion of probes, animals will be perfused with fixatives before decapitation and tissue collection;
- serie of animals for flow cytometry and molecular work: blood will be collected from the aorta until cardiac arrest of the animals. Saline solution will then be perfused before decapitation and tissue collection.

- **References are listed at the end of the box/part B.**

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

To determine group size, a statistical power calculation will be performed based on the Sachs' formula $n=2[(\alpha+\beta)^2 \times \sigma^2]/\Delta^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlijn, Springer Verlag). This is to guarantee that the sample size, in the respective experimental setup, will guarantee the detection of a given variation (decided prior). Our calculations will be based on previous own studies and existing publications.
In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,…), thus limiting the total number of animals to be used to achieve the study aims.

B. The animals

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

Species: Mus musculus
Strains: $Cx3Cr1^{GFP/WT}$ x $Thy1^{YFP/0}$ mice resulting from the crossing of $Cx3Cr1^{GFP/GFP}$ (Jackson Laboratory Stock number 005582) and $Thy1^{YFP/0}$ (Jackson Laboratory Stock number 003782) will be used while they are in their adult life stage.

$Cx3Cr1^{GFP/WT}$ have been widely used to follow microglia over time and investigate their contribution in many different pathological conditions [13,16–18], while $Thy1^{YFP/0}$ were used to follow the process of neuronal degeneration over time [16,19–21].

Mice from the 2 strains described above will be crossed to obtain $Cx3Cr1^{GFP/WT}$ x $Thy1^{YFP/0}$. Both separate strains as well as the crossed mice have been already bred locally and don't show any sign of discomfort. These crossed mice will offer thus the possibility to assess the impact of cerebral hypoperfusion on the microglial and neuronal states over time as well as their interplay during the development of the pathology.

Estimated numbers (see table below):

A first group of 40 animals is required for the optimization of the BCAS and cranial window techniques to be used with this animal model (pilot study). This is to ensure the success of the whole study.
The main goal of the pilot study is to implement the BCAS surgery locally. A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be also tested in combination with the cranial window surgery. The CBF reduction and the survival rate will be analysed and compared to the data from literature.
The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :
- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that does not exceed the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

For the BCAS experimental groups, taking into account the variability of the different measurements, the success rate of the surgical interventions (80-85%) and the 2 series of animals needed per group to collect fixed (immunohistochemistry of whole brains, 10 mice/group) and non-fixed tissues (flow cytometry on whole brain lysates, 10 mice/group), it can be estimated that a total of 25 animals per BCAS group and per timepoint (a + b) is required ((10+10)/0.8 = 25). For the Sham groups, the expected drop due to surgery being lower (5%), the total number of animals per Sham group and per timepoint is (10+10)/0.95 = 21.
The total number of animals requested for this project is summarized in the table below and is estimated to 224 mice over a period of 3 years.

Group nº	Goal	Surgery	Treatment	Sub-groups	Acute timepoint	Chronic timepoint	Estimated number of animals
Pilot	Optimization	Sham/ BCAS	-		x	x	40
1	Experimental	Sham	Vehicle	1a	x		21
				1b		x	21
2	Experimental	BCAS	Vehicle	2a	x		25
				2b		x	25
3	Experimental	Sham	Treatment	3a	x		21
				3b		x	21
4	Experimental	BCAS	Treatment	4a	x		25
				4b		x	25
	Total estimated number of animals						224

References:

1. Bollinger, J. L., Bergeon Burns, C. M. & Wellman, C. L. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. *Brain Behav. Immun.* **52,** 88–97 (2016).
2. Crain, J. M., Nikodemova, M. & Watters, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice. *J Neurosci Res* **91,** 1143–1151 (2013).
3. Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D. & Liu, F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation* **12,** 32 (2015).
4. Li, R. & Singh, M. Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Front Neuroendocrinol* **35,** 385–403 (2014).
5. Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82,** 380–397 (2014).
6. Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12,** 139 (2015).
7. Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35,** 2598–2603 (2004).
8. Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41,** 1278–1284 (2010).
9. Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34,** 319–337 (2013).
10. Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J. & Gan, W.-B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* **5,** 201–208 (2010).
11. Akkerman, S. *et al.* Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav. Brain Res.* **232,** 335–347 (2012).
12. Drew, P. J. *et al.* Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat. Methods* **7,** 981–984 (2010).
13. Lou, N. *et al.* Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113,** 1074–1079 (2016).
14. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38,** 2826–2832 (2007).
15. Gooch, J. & Wilcock, D. M. Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID). *Cell. Mol. Neurobiol.* **36,** 233–239 (2016).
16. Evans, T. A., Barkauskas, D. S., Myers, J. T. & Huang, A. Y. Intravital Imaging of Axonal Interactions with Microglia and Macrophages in a Mouse Dorsal Column Crush Injury. *Journal of Visualized Experiments* (2014). doi:10.3791/52228
17. Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 4106–4114 (2000).
18. Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155,** 1596–1609 (2013).
19. Feng, G. *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of

GFP. *Neuron* **28,** 41–51 (2000).
20. Greenberg, M. L. *et al.* Two-photon imaging of remyelination of spinal cord axons by engrafted neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111,** E2349–2355 (2014).
21. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* **1345,** 59–72 (2010).
22. Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. & Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* **26,** 627–634; discussion 635 (1995).

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:
Our study focuses on the interplay of 3 cellular compartments over time in presence or absence of a proper cerebral perfusion. There is no in vitro alternative method for this study. In adddition, the cognitive function will also be evaluated to assess the relevance of the study to the clinical situation. The use of an animal model is therefore mandatory to achieve the research aims.

Reduction:
The number of animals required per group is calculated, based on previous own studies and existing publications, to guarantee that the statistical power will be reached with the minimal number of animals.
In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,…).

Refinement:
The mice to be used are transgenic animals that harbor fluorescent proteins in the cells of interest. This enables tracking of those cells in vivo and a better imaging quality than any staining or labeling technique. Thus the critical steps associated with staining/labelling will be avoided. Those mice will undergo a well-established surgical intervention to induce cerebral hypoperfusion. The BCAS model has been validated in several studies to induce a 30% CBF reduction (microcoils with a diameter of 0.18 mm[7,8]) that is associated with cognitive dysfunction, and is therefore recognized as a relevant animal model for the study of vascular cognitive impairment[15]. The combination of this surgical intervention on the transgenic mice is the perfect combination to achieve the goals of the proposed study. In addition, several parameters will be collected from the same animals, thus allowing to better relate experimental observations within a same animal.

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

An adequate level of anesthesia will be induced to guarantee the absence of suffering during the surgical interventions. In addition, prior and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent suffering during the recovery from surgery.
Animals will be carefully examined throughout the entire duration of the study for the early detection of pain signs.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

The surgical procedures will be performed under general anaesthesia. The depth of anaesthesia will be monitored regularly by checking the presence of reflexes. Prior and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent and relieve the pain associated with the surgery.

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals do not exceed the humane endpoints defined for the study (part J).

In summary, the probability of suffering will be minimized by a combination of anesthesia, pain control, optimal housing as well as regular inspection of animal welfare.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1) As a result of the BCAS surgery, animals will exhibit a decreased cognitive function (expected);

2) Possible complications after cranial window surgery or BCAS surgery (e.g. damage to the cranial window caused by the animal: detachment of the dental cement border),;

3) Possible complications due to drug treatment due to an unknown toxicity.

Explain why these effects may emerge.

1) This effect is expected and is part of the pathology studied;

2) This effect might occur following the surgical interventions;

3) Although the treatment will be selected on different criteria including toxicological safety, it is not possible to predict the absence of toxicity in our particular model studied.

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

1) If the severity of the cognitive dysfunction leads to the humane endpoint described below (part J), the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;

2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, a.o.) and a solution will be implemented to avoid future complications.
Surgeries will be performed with sterile tools in an aseptic environment to prevent the occurrence of infections. In case of a skin infection, the wound will be cleaned with an antiseptic and an anti-inflammatory drug will be administrated to limit the associated inflammatory reaction. The infected animal will be monitored carefully and will receive a painkiller drug to avoid unnecessary pain. If the infection can't be controlled, the animal will be euthanized. In case the dental cement border of the cranial window is getting loose or has been detached by the animal, an administration of a painkiller will be done to avoid any unnecessary pain and a new dental cement protection will be created under anaesthesia.

3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Animals will be inspected regularly to monitor their welfare. The observations (body weight, overall condition, 18-points Garcia neurological score based on locomotor activity and body proprioception) will be registered in an animal welfare score sheet.

The Garcia neurological test will be used weekly to assess eventual motor and behavioral deficits

indicative of major neurological damage such as stroke. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum[22].

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following BCAS surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described[7];
- a Garcia score ≤ 10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will reflect a severe alteration of behaviour and locomotor activity due to a major cerebral injury.

Animals fulfilling one of these criteriae will be considered with severe discomfort and will be immediately euthanized to avoid any unnecessary stress and pain using a CO2-euthanasia system.

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low (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').

Procedure	**Expected level of discomfort (overall % of animals impacted)**
Animal handling, and body weight measurement	mild (100%)
Drug treatment (water or food)	mild (50% - 3a, 3b, 4a, 4b)
Thinned skull cranial window surgery & imaging	mild (100%)
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) or Sham	moderate (100%)
Consequences of BCAS	moderate (50% - Pilot, 2a, 2b, 4a, 4b)
Brain laser Doppler flowmetry (LDF)	mild (100%)
Y-maze alternation task	mild (100%)
Object Location Task (OLT)	mild (100%)
Barnes maze test	mild (50% - 1b,2b,3b,4b)
Cumulative discomfort – Pilot study	**moderate**
Cumulative discomfort - Experiment	**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.

The study required analysis of brains post-mortem.

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 PV 2017-001/[redacted]

Preambule;
De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700

2. **Titel van het project:** *Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*

3. **Titel van de NTS:** *Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie*

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

5. **Contactgegevens DEC:**
   - naam DEC: *DEC-UM*
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon: secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

6. **Adviestraject** (data dd-mm-jjjj):
   - **X** ontvangen door DEC; 11-05-2017
   - ☐ aanvraag compleet
   - **X** in vergadering besproken; 19-05-2017
   - ☐ anderszins behandeld
   - **X** termijnonderbreking van 25-05-2017 tot 14-07-2017
   - ☐ 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 IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD. Zie ook de verklaring van de vertegenwoordiger van de vergunninghouder onder punt 6 ondertekening van de aanvraag.

8. **Eventueel horen van aanvrager:** ***N.V.T.***

9. **Correspondentie met de aanvrager:**
   - Datum; 25-05-2017

Gestelde vragen en antwoorden:

3 Algemene projectbeschrijving
3.1 Achtergrond

Vraag:

1. In hoeverre is het effect van een lekkende BBB toe te schrijven aan microglia, m.a.w., kunnen er niet nog tal van andere mechanismen een rol spelen en in hoeverre kunnen die eventueel worden meegenomen in het project.

Antwoord:
In addition to microglia, other immune cells may play a role in Vascular Cognitive Impariment pathologies following BBB injury. The main focus of the proposed study is on microglia but in case findings show a limited impact of microglia in this model, other immune cells may be investigated as a rescue plan. Another animal project, specifically designed for the study of immune cell contribution in sporadic hypertensive cSVD, has been submitted to the animal welfare body.

3.2 Doel

Vragen:

1. De DEC-UM verzoekt u bij Aim 1 ook infiltratie toe te voegen?

Antwoord:
This project is not aimed to study the contribution of infiltrated immune cells in VCI. As explained in the previous answer (above), the infiltration of immune cells will be studied as an alternative plan or as a sub-study but the design of the experimental project has been prepared for the study of microglia primarily.

2. De DEC-UM vraagt zich af of Aim 2, zoals deze nu omschreven is, niet reeds vervat zit in Aim 1. Tevens is het niet duidelijk waar de verder beschreven behandeling onder valt.

Antwoord:
The experimental groups in the proposed project will target both Aim 1 and 2. The study of the animal groups 1 and 2 will provide data for Aim 1 while the animal groups 3 and 4 will be compared to the groups 1 and 2 to target the Aim 2.

3.3. Belang

Vragen:

1. Hoeveel cognitieve impairment/dementie is het gevolg van een vasculaire dysfunctie? Nu lijkt het alsof dit 100% is.

Antwoord:
This is still unclear as tools/biomarkers to assess BBB dysfunction in patients using MRI strategies are still being developed and are not incorporated in the routine diagnostic investigations. More clinical research is thus needed to determine the exact extent of the vascular damage to cognitive impairment/dementia cases. A short explanation has been added in the text.

2. In hoeverre onderscheidt het korte- versus lange-termijn geheugenverlies zich van retrograde of anterograde amnesie?

Antwoord:
Short and long-term memories differ from retrograde amnesia since the memory about the location of the object in the case of the OLT is formed after potential brain injury (except in the very unlikely situation when a brain injury might occur during the inter-trial period of the test (1h or 24h)). The expected short- and long-term memory losses are partly overlapping with anterograde amnesia. In anterograde amnesia, there is a failure to store new information: it means to convert short-term memory into long-term memory.

3. De DEC-UM vraagt zich af of in de projectopzet ook een verband gezocht wordt tussen de mate van (on)gevoeligheid voor BCAS en microglia (dys)functie?

Antwoord:
No, it may be scientifically/statistically difficult to find inter-individual differences for cerebral hypoperfusion sensitivity and potential microglial dysfunction.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vragen:

1. In het kader van een reductie van het aantal proefdieren vraagt de DEC-UM zich af of een Sham groep bij de pilot nodig is om BCAS aan te leren?

Antwoord:
The Sham group is of importance for the pilot study for the following reasons:
- Statistical validation of the decrease of the cerebral blood flow (laser Doppler). Sham and BCAS groups should be balanced (similar n) for a proper validation. Indeed, the BCAS surgery should lead to a reproducible reduction of the cerebral blood flow with a drop-out post-surgery that corresponds to the expectations (approximately 20%);
- the pilot study is not only required to learn the BCAS surgery but also to assess its feasibility in combination with the cranial window surgery and imaging. It is of major importance to demonstrate the BBB integrity in the Sham animals over time to be able to assess the BBB dysfunction in the BCAS mice.

2. Waarom wordt geopteerd voor een bilaterale BCAS? De achtergrond lijkt te suggereren dat dit niet noodzakelijk is.

Antwoord:
The diameter of both carotids need to be reduced to lead to a sustained CBF reduction.

3. De DEC-UM vraagt om duidelijk aan te geven dat de craniale window operatie eerst gebeurt. Nu is dit op verschillende plaatsen onduidelijk.

Antwoord:
This has been modified accordingly.

4. De DEC-UM vraagt zich af of hoe het mogelijk is om activiteit te meten van de microglia met de aangegeven transgene muis. Het lijkt alsof enkel expressie kan worden opgevolgd.

Antwoord:
The microglial phenotype can be assessed over time by morphological analyses (soma volume, length of processes). A more refined analysis of the microglial activity can be done ex vivo by IHC and flow cytometry.

5. De DEC-UM vraagt om hier al duidelijk aan te geven hoe cognitieve impairment wordt bestudeerd.

Antwoord:
A short description of the cognitive tasks to be performed has been added in the paragraph 3.4.1.

6. De DEC-UM vraagt zich af welke behandeling gekozen wordt. In het schema staat 1 behandeling aangegeven. Indien nog geen behandeling gekozen is, graag beargumenteren welke de besliscriteria zijn.

Antwoord:
The definite treatment choice (only one treatment) will be made at the end of other ongoing animal studies (not the proposed project) in which safety and efficacy will be assessed. The choice will be made during the preparation of the work protocol. This answer has been added to the corresponding paragraph.

7. Mogelijke drop-out van BCAS is aangegeven. Is dit ook duidelijk voor het craniale window?

Antwoord:
There is no drop out expected for the cranial window surgery, as the surgery is already mastered and the cranial window itself does not cause any injury to the animal.

8. De DEC-UM vraagt zich af of de behandelingsgroepen niet na de vehicle groepen kunnen gedaan worden. Wat als microglia niet betrokken zijn (dan lijkt behandelingsgroep overbodig)?

Antwoord:
I understand the reasoning for the proposed 2-steps approach. Such sequential approach has been proposed initially. However taking into account the high chance of observing microglial actvation in this model (based on literature), this 2-step approach has been finally deleted in order to reduce the number of animals. Indeed, if microglia are activated upon cerebral hypoperfusion (which is likely), then the interventional study will have to include also non treated animals (similarly to the first study with no treatment). The one-step approach proposed is therefore thought to reduce the number of animals.

9. Wat als er meer oefening nodig is? Is het dan niet handig om op voorhand meer pilot dieren aan te vragen? Nu staat er dat het project dan gestopt wordt.

Antwoord:
It is indeed difficult to assess the number of animal required to learn the BCAS surgery, to combine it with the thinned skull cranial window surgery and the imaging. I initially estimated that a total number of 20 mice would be enough (10 Sham / 10 BCAS) to validate the procedure. However I agree it is safer to plan more animals than needed (20 Sham / 20 BCAS) and to decide for a threshold to stop the pilot study. Thus, as soon as 10 successful surgeries (BCAS combined with cranial window) will be performed per group, with reaching of the already mentioned criteria (reproducible reduction (-20 to -40%) of CBF, drop-out rate for BCAS limited to 20%; good visualization of vasculature, microglia), no additional animals will be used for the pilot project and the study of the experimental groups will be initiated. By requiring 10 successful experiments per group, this will guarantee the success of the whole project.
The rectified number of animals for the pilot study and the explanation for the proposed threshold have been added to the project.

<u>3.4.2</u>
Vragen:

1. De Y-maze betreft een gevoelige taak met geregeld snelle habituatie/desensitisatie. In hoeverre houden de onderzoekers hiermee rekening gezien het feit dat er wordt beoogd dat deze taak herhaaldelijk wordt gebruikt?

Antwoord:
As proposed in the Appendix 1, this task will be performed only twice: at the "acute" and "chronic" timepoints with a "washout" period of approximately 3 weeks. The desensitization is therefore thought to be limited.

3.4.4
Appendix 1
Vragen:
A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. De DEC-UM vraagt om duidelijk te beargumenteren waarom enkel mannelijke dieren gebruikt kunnen worden. Wat zijn deze "sex differences"?

Antwoord:
Sex-specific differences that may have an impact on the studied pathological mechanism have been described with more details.

2. Hier worden 2 behandelingsmethodes beschreven, terwijl in de figuur maar 1 gekozen wordt. Welke en waarom?

Antwoord:
The therapeutic intervention proposed will target microglia cells. There are currently studies ongoing evaluating strategies for microglial cell depletion or inhibition of microglial activity. Therefore both options are presented for the present project but only one option will be chosen and applied. The relevant choice will be made at the time of the study start once more results will be available regarding both therapeutic strategies.

3. De DEC-UM vraagt ook om kort de procedure van de craniale window te beschrijven, aangezien dit ook gedaan is voor BCAS en TPLSM.

Antwoord:
A short description has been added.

4. Kunnen de onderzoekers verhelderen wat de toegevoegde waarde is van het testen van zowel de OLT als de Barnes Maze? Beiden testen spatieel hippocampaal geheugen, op korte dan wel lange termijn (interval)? Ook de OLT is laag qua stressniveau (nu als argumentatie voor Barnes Maze gehanteerd).

Antwoord:
Both tasks test indeed the spatial memory of the animals. However the OLT will assess more the short-term/working memory while the Barnes maze task will assess the long-term spatial learning and memory. In addition, it won't be possible to perform the Barnes maze task for the acute hypopefused groups due to time limitation between the induction of the hypoperfusion and the sacrifice of the animals.

B. De Dieren.

5. Aangezien de verhoogde verwachtte uitval bij de BCAS groepen, zou de groepsgrootte daarop verder moeten worden aangepast met de Sham groep en dienen de B groepen dan gelijk van grote te zijn in vergelijking met de A groepen?

Antwoord:
The expected drop of animals in the BCAS groups (20%) compared to the Sham groups (5%) being higher, it is indeed possible to reduce the size of the Sham groups. The adapted calculation is provided in the text and the corresponding table has been amended as well.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen.
6. Effecten voor craniale window zijn niet omschreven.
Antwoord:
The only adverse effect that can take place after cranial window surgery is the removal or detachment of the dental cement border fixed on the skull. This has been inserted in the text in the description part for the possible adverse effects and the measure to be adopted has been also added in the next paragraph.

J. Humane eindpunten.
7. Wordt er niet een Garcia score > 10 bedoeld als humaan eindpunt?
Antwoord:
No, in the Garcia scale, a maximal score of 18 corresponds to a normal healthy animal without any sign of locomotor and proprioception impairments. 6 quick tests looking at the sensorimotor function are graded from 0 to 3 (3 = normal; 0 = severe impairment)

K. Classificatie van ongerief.
8. Craniale window lijkt de DEC-UM minder invasief/minder discomfort dan BCAS procedure en toch gelinkt met een hogere ongerief score.
Antwoord:
Indeed, this was a mistake and it has been corrected.

- Datum antwoord; 14-07-2017
- Verstrekte antwoorden; zie hierboven
- De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. **Eventuele adviezen door experts: *N.V.T.***

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. ***JA***

2. De aanvraag betreft een ***nieuwe*** aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? ***JA***

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. ***N.V.T.***

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

   Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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

   Voor zover de DEC-UM de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke tegenstrijdigheid met wettelijke bepalingen dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

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.

   Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.

   Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

   Het directe doel van het project is onderzoek naar de rol van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotis-stenose.
   Het uiteindelijke doel is het ontcijferen van de pathologische cascade die is gekoppeld aan cerebrale hypoperfusie.
   Het betreft hier een fundamenteel wetenschappelijk project.
   Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC-UM acht het waarschijnlijk dat er belangrijke stappen richting het uiteindelijke doel gezet kunnen worden binnen de duur van dit project.
   De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is, wat de positie van de eigen onderzoeksgroep daarin is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn.
   De DEC-UM is op grond hiervan van mening dat het directe doel, onderzoek naar de rol van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose, gerechtvaardigd is 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.

   De belangrijkste belanghebbenden *in dit fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op begrip van de bijdrage van vasculaire dysfunctie aan het ontstaan van cognitieve beperking, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep, d.w.z. patiënten met cognitieve beperkingen en dementie en hun naasten en de medische wetenschap.*

   Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie, het gaat hier om transgene proefdieren, de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen matig ongerief ondervinden.*

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: *De onderzoekers zullen nieuwe medisch-wetenschappelijke inzichten verkrijgen en deze kennis delen met de medisch-wetenschappelijke gemeenschap.*

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: *Verbeterde kennis over het ontstaan van cognitieve beperkingen kan mogelijk leiden tot aanzetten tot preventie en therapie. Aangezien cognitieve beperkingen en dementie een zware last zijn voor de getroffenen en hun omgeving, kan ook de kwaliteit van leven verbeterd worden van deze patiënten en hun naasten.*

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

   Voor zover de DEC-UM de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC-UM wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. Mochten de DEC-UM signalen bereiken aangaande mogelijke effecten op het milieu dan zal zij onverwijld de vergunninghouder daarvan op de hoogte stellen.

   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.

   Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe.

   De DEC-UM 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-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in 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. ***N.V.T.***

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

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is op basis van de daartoe strekkende verklaring (in duplo) van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder, als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 der ondertekening van de aanvraag en punt F in de bijlagen.

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

    Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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.

    De integriteit van de dieren zal worden aangetast door: Door de genetische modificatie, de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind van de proef.

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.

    Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

    3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe.

    De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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.

    Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

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.

    De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen zonder dat dit het behalen van de doelstelling in de weg staat. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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

    Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

    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.

    De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren.
    De DEC-UM is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met dergelijke dieren uit te voeren.

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.

    Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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

    NTS

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

    Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het onderzoek naar de rol van van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation?"*

2.
Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel*.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*
Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *substantieel voordeel.*
Algemeen: *relevante groei van medische kennis met potentieel maatschappelijke impact.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen die op termijn worden getroffen door cognitieve beperking en dementie en hun naasten binnen het project "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation"* zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven tot de dood na matig ongerief.
De dieren worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de genetische modificatie, de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.
Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter bijdragen aan de kennis over het ontstaan van cognitieve beperkingen en dementie. Deze kennis kan behulpzaam blijken bij de preventie van cognitieve beperkingen en dementie en bij eventuele therapie.
Voor toekomstige patiënten en hun naasten is het belangrijk dat de beschikbare preventiemethoden en eventuele therapie telkens worden verbeterd. Ten opzichte van de huidige mogelijkheden kan daardoor de ernst van de ziektelast voor patiënten afnemen. Tevens zou dit bijdragen aan de verbetering van kwaliteit van leven voor patiënten en hun naasten.
Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang.
Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3.
De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag:" Rechtvaardigt het onderzoek naar de rol van van microglia bij cognitieve beperkingen ten gevolge van cerebrale hypoperfusion veroorzaakt door carotisstenose, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation*?" bevestigend.
Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.
De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis. Aan het begin van dit onderzoeksproject wordt er een extern deskundige bij betrokken om de benodigde technische expertise te waarborgen.
Er is geen sprake van duplicatie.
In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning.
De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.
Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden.
De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.
Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation"* als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "*Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation"* van een positief advies.

6.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
[redacted]
Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT

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
AVD1070020172885

Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 augustus 2017. Het gaat om uw project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1070020172885. 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.

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020172885

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1070020172885

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	10700
Naam instelling of organisatie:	Universiteit Maastricht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	50169181
Straat en huisnummer:	Minderbroedersberg 4-6
Postbus:	616
Postcode en plaats:	6200 MD MAASTRICHT
IBAN:	NL04 INGE 0679 5101 68
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 september 2017
Geplande einddatum:	1 september 2020
Titel project:	Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation
Titel niet-technische samenvatting:	Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie
Naam DEC:	DEC UM
Postadres DEC:	Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC:	secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Maastricht
Datum:	7 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
[redacted]
Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT

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
AVD1070020172885

Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 8 augustus 2017
Vervaldatum: 7 september 2017
Factuurnummer: 172885

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1070020172885	€ 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.

7.

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: woensdag 23 augustus 2017 14:42
Aan: Info-zbo
CC: [redacted]
Onderwerp: Re: AVD1070020172885:aanvullende informatie
Bijlagen: AVD1070020172885 aanvraag-projectvergunning V2.docx; AVD1070020172885 Appendix 1 V2.docx; AVD1070020172885 NTS v2.docx; AVD1070020172885 project proposal V2.docx

Categorieën: Dossier: [redacted]

Dear [redacted], Dear CCD officers,

Thanks for your e-mail. Please find below my answers to the questions raised during the review of the project application **AVD1070020172885**. Please find attached the corresponding corrected files**.** Corrections made on the previous version are highlighted in gray in the text.

-"U geeft aan dat het ongerief Matig is. Uit de humane eindpunten valt echter op te maken dat de dieren worden gedood als ze ernstig ongerief hebben. Dit betekent dat de humane eindpunten ernstig ongerief niet voorkomen en maximaal 5% van de dieren ernstig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te verhelderen en de bijlage dierproeven aan te passen."

Answer: The overall discomfort for the animals will be moderate. However in case the pathological condition would be worst than expected for some animals (incidence 5% maximum), these animals will be euthanised to avoid unnecessary discomfort using the defined human endpoints. The regular inspections to monitor the animal welfare that include the registration of the body weight, general behaviour and neurological score, will serve to ensure that the animals do not reach a severe discomfort. We aim to detect early signs of a potential transition from moderate to severe discomfort. This has been clarified accordingly in the text.

- "U wordt verzocht de NTS aan te passen: De titel is niet begrijpelijk voor een leek en u geeft niet aan waarom de dieren worden gedood."

Answer: The title of the NTS has been changed to improve its understanding by the society. The previous title "Cerebrale hypoperfusie en neuro-inflammatie" has been changed to "Verminderde bloedtoevoer in de hersenen en dementie". This has been implemented in the NTS document as well as in the aanvraag-projectvergunning file. In addition, one sentence has been added to explain why the animals are sacrificed at the end of the experiment (brain collection for analysis).

I remain at your disposal should the CCD have further questions.

[redacted]

De : Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Date : Wednesday, 23 August 2017 at 12:18
À : [redacted]

[redacted]
Objet : AVD1070020172885:aanvullende informatie

Geachte [redacted],
Op 7 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1070020172885. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.
-U geeft aan dat het ongerief Matig is. Uit de humane eindpunten valt echter op te maken dat de dieren worden gedood als ze ernstig ongerief hebben. Dit betekent dat de humane eindpunten ernstig ongerief niet voorkomen en maximaal 5% van de dieren ernstig ongerief ondergaan. U wordt verzocht dit te verhelderen en de bijlage dierproeven aan te passen.
-U wordt verzocht de NTS aan te passen: De titel is niet begrijpelijk voor een leek en u geeft niet aan waarom de dieren worden gedood.

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

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

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

[redacted]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)
-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 8 augustus 2017 13:28
Aan:[redacted]
Onderwerp: OntvangstBevestiging 2885
Geachte [redacted],
Deze brief is ook per post verzonden.
Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Centrale Commissie Dierproeven

8.

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*	10700
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]	
KvK-nummer	50169181	

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	Minderbroedersberg	4-6
Postbus	616	
Postcode en plaats	6200 MD	MAASTRICHT
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	

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		☐ 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	[redacted]
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		☒ Nee	

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 9 - 2017
		Einddatum	1 - 9 - 2020
3.2	Wat is de titel van het project?	Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Verminderde bloedtoevoer in de hersenen en dementie	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC UM
		Postadres	POSTBUS 616 6200 MD MAASTRICHT
		E-mailadres	secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

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	
Functie	
Plaats	
Datum	- -
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven

9.

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'.	10700
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	MAASTRICHT UNIVERSITY
1.3	Provide the title of the project.	Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation

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.

Carotid artery stenosis, as a result of hypertension, dyslipidemia, diabetes as well as ageing, interferes with the cerebral autoregulation and leads to cerebral hypoperfusion. This is considered as a major trigger for the development of vascular cognitive impairment (VCI)[1]. Following the induction of

carotid artery stenosis in mice, their cognitive function is selectively impaired over time (working memory altered first, followed by impairment of short/long-term memories at a chronic timepoint)[2,3]. However the different key players involved in this pathological cascade and their involvement in a time-dependent manner remain elusive. We showed that microglia cells are involved in the pathological cascade of hypertension-induced VCI[4]. Indeed, leakages of the blood brain barrier (BBB), due to the elevated blood pressure, are associated with an increased density and activation of microglia.

Microglia are the resident immune cells of the brain and protect it from neurodegeneration. Brain injury, including cerebrovascular injuries[5], leads to morphological changes, migration and proliferation of microglial cells at the site of injury. In addition to the phagocytosis of dead cells and debris, activated microglia also release cytokines to maintain local homeostasis, and therefore protect neuronal function. This protective phenotype is believed to take place in an acute manner. However upon exposure to chronic pathological conditions, microglial activation is associated with neurotoxic functions and the emergence of an aberrant inflammatory response (increased synthesis of cytokines: a.o. IL-1β, TNF-α, IL-6[6]) a phenomenon leading to neurodegeneration[7].

Although their ability to activate upon hypoxic conditions has been proven in vitro[8], there is no direct in vivo evidence linking tissue hypoperfusion to microglial activation. Furthermore the subsequent consequences of microglial activation on cerebrovascular (BBB) and neuronal integrities is unknown. It is therefore of utmost importance to study their activity in vivo over time (upon acute and chronic hypoperfusion).

In addition to microglia, other immune cells may play a role in Vascular Cognitive Impariment pathologies following BBB injury. The contribution of other immune cells in this pathological condition will be studied in case findings regarding the impact of microglia in this pathology is limited.

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?

Overall objective:
The aim of the present study is to decipher the pathological cascade associated with cerebral hypoperfusion. In particular the present project will investigate the role of microglia cells on the vascular and neuronal compartments during cerebral hypoperfusion.

Aim 1: Pathological cascade of cerebral hypoperfusion
Determine if acute and chronic cerebral hypoperfusion are associated with Blood Brain Barrier leakages, microglial activation, neurodegeneration and cognitive impairment.

Aim 2: Modulation of microglial activity/presence during cerebral hypoperfusion
Determine if microglia cells exhibit a protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion by modulating their function and/or density in the brain.

Achievability:
This research project is achievable within a reasonable time frame (3 years) and with a limited number of animals. Most of the techniques, including the thinned skull cranial window, required to perform this project are already present within the research group. The involved researchers have a long-standing experience with the main procedures described in this project: carotid surgery, cerebral blood flow measurement, cranial window, in vivo imaging, behavioural tasks and animal perfusion. In addition, the implementation of BCAS surgery, which is a similar surgery that one already mastered on site (placement of a carotid cuff), will be taught by external researchers experts in this technique (national collaboration).

3.3 Relevance

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

Cognitive impairment and dementia, are major disabilities increasing due to population ageing. The World Health Organization estimates that 35 million people live with dementia and expects this number to triple by 2050[9]. Major progresses in the last decade have revealed the contribution of vascular dysfunction to cognitive impairment[10], but the extent of this contribution to all cognitive impairment/dementia cases is still unclear as tools/biomarkers to detect small vessel disease pathology in the brain have been only validated recently. Vascular Cognitive Impairment (VCI) encompasses all the cognitive disorders associated with cerebrovascular disease, from frank dementia to mild cognitive deficits[1]. The present project is therefore of major importance to improve our understanding of the pathology and to identify potential therapeutic target to limit/delay its progression.

3.4 Research strategy

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

3.4.1 – Project design

Project description

Animals and surgery

Transgenic reporter mice expressing Green Fluorescent Protein (GFP) in microglia (Cx3Cr1-GFP) and Yellow Fluorescent Protein (YFP) in neurons (Thy1-YFP) will undergo a thinned-skull cranial window surgery followed by a Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS) procedure to induce cerebral hypoperfusion (or sham operation)[11,3]. Two-photon imaging of the cerebral cortex through the thinned-skull cranial window will allow the study over time of the vascular, microglial and neuronal compartments.

Cerebral blood flow, in vivo imaging and cognitive function (Aim 1 & 2)

At all timepoints, the cerebral blood flow will be measured using a trans-cranial laser Doppler flowmeter.
In vivo imaging (via the cranial window) will be performed before the BCAS surgery, few days after (acute timepoint) and up to one month after the surgery (chronic timepoint), in order to assess the activity/phenotype of microglia over time. The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery (acute and chronic). Investigations of the cognitive function at both (acute anc chronic) timepoints is needed as it has been suggested that working and short-term memories may be impaired at an earlier timepoint than long-term/reference memory in this model[3]. Working memory will be assessed with the use of a Y-maze alternation task, short-term and long-term memory with an Object Location task and spatial learning and long-term memory with the Barnes maze task. Brains from sham and BCAS reporter mice will be harvested for further investigations of microglial phenotype by flow cytometry and for 3D histology[12].

Treatment (Aim 2)

A pharmacological intervention to modulate the activation of microglia or to decrease their density will be performed in sham and BCAS mice. Targeting microglia in BCAS animals will allow us to decipher their protective or deleterious role during cerebral hypoperfusion. One possible approach (amongst others) to investigate the role of microglia is to use a therapeutic intervention to deplete the microglial population via inhibiting CSF1 receptor signaling. This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals[13,14]. The definite treatment choice will be made at the end of other ongoing animal studies (not the proposed project) in which safety and efficacy will be assessed. The choice will be made during the preparation of the work protocol.

Experimental design

1) Pilot study

A pilot study will be performed to implement the BCAS surgery and to validate the readouts for in vivo imaging in this animal model before the study of the experimental groups.
A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be tested in combination with the cranial window surgery.

In this pilot study both Sham and BCAS groups are required.
The Sham group is of importance for the pilot study for the following reasons:
- Statistical validation of the decrease of the cerebral blood flow (laser Doppler). Sham and BCAS groups should be balanced (similar n) for a proper validation;

- the pilot study is not only required to learn the BCAS surgery but also to assess its feasibility in combination with the cranial window surgery and imaging. It is of major importance to demonstrate the BBB integrity in the Sham animals over time to be able to assess the BBB dysfunction in the BCAS mice.

The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :

- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that corresponds to the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

20 mice per group (Sham/BCAS) are planned for the pilot study. However a soon as the threshold of 10 successful experiments (BCAS + cranial window + imaging) will be reached per group (with the above-mentioned criteria), no additional animals will be used for the pilot project and the study of the experimental groups will be initiated.

2) Acute and chronic BCAS to evaluate the pathological cascade and effects of microglia modulation as defined in aims 1 and 2

A phased design between the acute and chronic timepoints is not possible within this project. Indeed, while acute hypoperfusion can lead to a decline in the working memory, short and long-term memory impairment can only be detected after a longer exposure to hypoxic conditions[3,2]. It is therefore mandatory to study both timepoints as the brain areas targeted by acute and chronic hypoperfusion can differ (in relation to the type of memory dysfunction). In addition, it is known that microglial behaviour can differ between acute and chronic stimuli, harbouring respectively either a protective or a deleterious phenotype. Their study over time is therefore also required.

The different steps of the project and their logical sequence are shown in Figure 1 (below, next page).

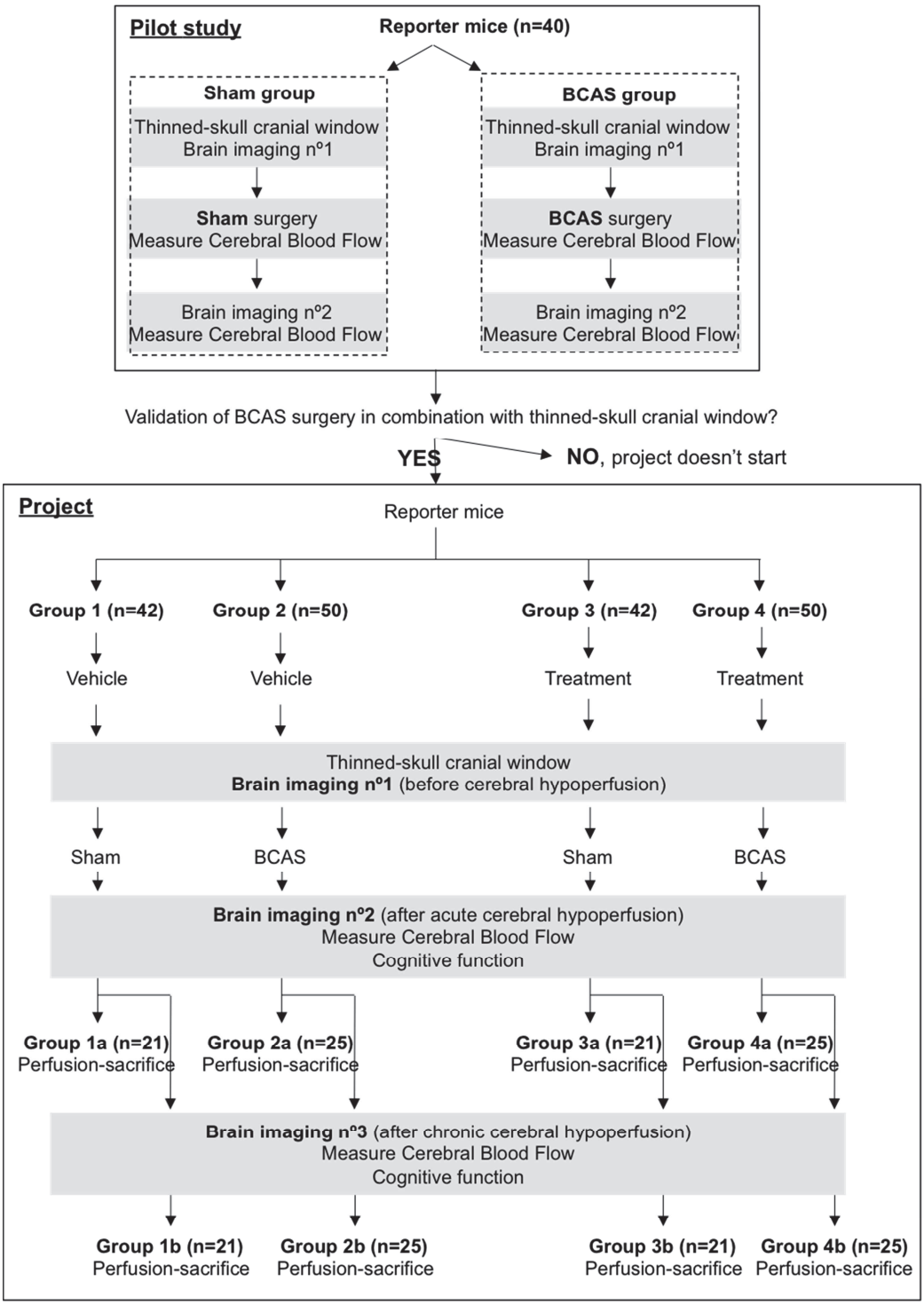


Figure 1: Overall design of the project

References:
1. Iadecola, C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron* **80,** 844–866 (2013).
2. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38,** 2826–2832 (2007).
3. Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41,** 1278–1284 (2010).

[redacted]

5. Nishimura, N. & Schaffer, C. B. Big effects from tiny vessels: imaging the impact of microvascular clots and hemorrhages on the brain. *Stroke* **44,** S90–92 (2013).
6. Perry, V. H. & Holmes, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* **10,** 217–224 (2014).
7. Luo, X.-G., Ding, J.-Q. & Chen, S.-D. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener* **5,** 12 (2010).
8. Li, F. *et al.* Hypoxia induced amoeboid microglial cell activation in postnatal rat brain is mediated by ATP receptor P2X4. *BMC Neurosci* **12,** 111 (2011).
9. World Health Organization & Alzheimer's Disease International. *WHO | Dementia: a public health priority*. (2012).
10. Gorelick, P. B. *et al.* Vascular contributions to cognitive impairment and dementia: a statement for healthcare professionals from the american heart association/american stroke association. *Stroke* **42,** 2672–2713 (2011).
11. Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35,** 2598–2603 (2004).
12. Pan, C. *et al.* Shrinkage-mediated imaging of entire organs and organisms using uDISCO. *Nat. Methods* **13,** 859–867 (2016).
13. Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82,** 380–397 (2014).
14. Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12,** 139 (2015).
15. Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34,** 319–337 (2013).

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.

3.4.2 – Procedures

Listing of the procedures:
- Handling and weighting the animals;
- Sham or BCAS surgery;
- vehicle or drug treatment;
- cerebral blood flow measurements using a laser-doppler flowmeter;
- thinned skull cranial window;
- in vivo 2-photon imaging;
- behavioural tasks (Y-maze alternation task, Objection Location task, Barnes Maze test);
- perfusion +/- fixation for histology and flow cytometry.

In vivo/Ex vivo imaging:
The thinned skull cranial window performed on transgenic reporter mice that will express fluorescent probes in microglia and neurons (Cx3Cr1-GFP x Thy1-YFP) will allow the study of the vascular, microglial and neuronal compartments over time as follow:
- The cortical vasculature will be visualized after the injection of a chemical dye which should not leaked from the lumen to the brain parenchyma due to its size. The presence of the dye outside of the vasculature will indicate a dysfunction of the blood brain barrier. Leakages will be imaged and quantified;
- Microglia behaviour: density and morphology such as cell volume, length of microglial processes, distance from vessel/leakage;
- Neuronal integrity: axonal degeneration.
Ex vivo imaging of the isolated brains will allow further investigations within the whole brains using 3D histology (acute and chronic timepoints).

Behavioural tasks:
A set of behavioural tasks will be performed after the sham/BCAS surgeries (acute and chronic timepoints):
- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task[15];
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location

Task[15];
- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test[3] (only chronic timepoint).

Sacrifice:
Sham and BCAS mice will be sacrificed at both acute and chronic timepoints for brain extraction, microglia isolation and flow cytometry work. Using microglial/macrophage specific markers, the phenotype of microglia cells will be characterized and compared between groups.

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.

3.4.3 Planning – coherence

The steps of the project are shown in Figure 1.
- The first cranial window in vivo imaging session will be done before the induction of hypoperfusion or sham procedures in order to collect baseline data for later comparison with the next timepoints;
- The treatment (or vehicle) to interfere with microglial function/presence will be performed before the induction of hypoperfusion as well to be able to understand the impact of microglia at both acute and chronic timepoints of hypoperfusion;
- The cerebral blood flow (laser Doppler) will be assessed at the baseline before induction of hypoperfusion, right after the surgery to guarantee the efficiency of the surgical procedure, and at each timepoint of the study:
- Acute timepoint: few days after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;
- Chronic timepoint: approximately 1 month after the initiation of hypoperfusion/sham procedure;

Coherence
After induction of cerebral hypoperfusion, the integrity of the BBB is expected to be altered, leading to leakages of blood components/cells to brain parenchyma. Subsequently microglia will become activated to phagocyte the components that invade the brain. This acute hypoperfusion combined with acute microglial activation is expected to have a limited impact (as for amplitude and localization) on neuronal viability/function, with a cognitive dysfunction limited to working memory. However, following a chronic hypoperfusion, the BBB damage is expected to be more extended and associated with a deleterious microglial phenotype with exaggerated pro-inflammatory actions. As a consequence, neuronal injuries may take place in multiple cognitive domains leading to subsequent deficits in short and long-term memory tasks. By modulating microglial density and/or activity in the treated groups, the pro-inflammatory profile due to microglia is expected to decrease, affording therefore neuroprotection and a maintained cognitive function in this disease model.
Although cranial window imaging technique offers temporal resolution, it is limited to cortical areas. Therefore immunohistochemitry studies at both acute and chronic timepoints will be performed on whole brains to further investigate the brain pathological changes in deeper areas. Furthermore flow cytometry of brain tissues will offer complementary phenotypic informations (markers of activation) on microglial populations at both timepoints.

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	Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	MAASTRICHT UNIVERSITY
1.3	List the serial number and type of animal procedure. *Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.*	Serial number: 1 Type of animal procedure: Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging

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 type and sequence of the animal procedures is summarized in the figure 1 and listed below.
Ten animal groups will undergo these procedures (Pilot Sham, Pilot BCAS, group 1a, group 1b, group 2a, group 2b, group 3a, group 3b, group 4a, group 4b):

Groups	Pilot		1 (a&b)	2 (a&b)	3 (a&b)	4 (a&b)
Goal	Optimization		Experimental groups			
Surgery	Sham	BCAS	Sham	BCAS	Sham	BCAS
Treatment	No		Vehicle	Vehicle	Treatment	Treatment
Timepoints	Acute & chronic		Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)	Acute (a) & chronic (b)

Only male mice will be studied as sex differences have been reported for microglial activation [1–3] but also cognitive impairment disorders[4]. Sex-specific differences in gene expression have been observed in resting microglia that may lead to a dfferential response upon exposure to a trigger. This has been confirmed in studies showing a differential microglial activation during stress and hypoxic conditions[1–3]. It is therefore very likely that the microglial response to BCAS may differ between genders. Because the inclusion of both genders may increase the variability, thus decrease the statistical power and limit the interpretation of the data, only male mice will be included in this study.

List of animal procedures:

Drug treatment

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The reporter mice will be treated with a drug either to deplete microglia cells or to decrease their activation. One possible therapeutic intervention is the depletion of microglial population via inhibiting CSF1 receptors (e.g. PLX5622). This technique has been previously used successfully in different animal models including an Alzheimer mouse model, and had no impact on the welfare and behaviors of the animals[5,6]. The dose of the treatment will be selected based on published animal studies that have shown evidences for its efficiency and its toxicological safety. It will be administered throughout the whole study period (in food pellets or drinking water) to investigate the contribution of microglia cells to hypoperfusion-induced vascular dementia.

Cranial window surgery and imaging

The reporter mice will undergo a thinned-skull cranial window surgery.

This minimaly invasive procedure consists of the thinning of the skull in a small area to allow the vizualisation of vessels, microglia and neurons below the skull surface, without opening of the cranial box thanks to two-photon microscopy.

This technique will allow the chronic imaging of:

- the cerebrovascular permeability (permeability to injected fluorescent probes);
- the microglial behaviour (density, cell volume, location);
- the neuronal integrity (axonal integrity of cortical neurons).

In vivo brain imaging sessions will be performed before the induction of cerebral hypoperfusion, soon after the induction of hypoperfusion (1-3 days) and after a longer period (c.a. 4-5 weeks). This will give new insights into the pathology development over time.

Bilateral Common Carotid Artery Stenosis (BCAS)

This well-established procedure leads to a moderate cerebral hypoperfusion due to the narrowing of the common carotid arteries (CCAs) using microcoils. In average the cerebral blood flow is reduced with 30% (cerebral blood flow maintained around 70% compared to Sham animals) with a survival rate of 80-85% via the use of microcoils with a diameter of 0.18 mm[7,8].

Cerebral Blood Flow (CBF) measurements

The efficacy of the BCAS procedure will be assessed by the measurement of the CBF before the narrowing of the CCAs, right after the surgical procedure as well as at several time points throughout the studies to follow the severity of the hypoperfusion in each individual animal. CBF measurements will be achieved by using a trans-cranial laser Doppler flowmeter. The laser-doppler probe will be glued on the skull surface for a short time period allowing recording of the CBF.

Cognitive evaluation

N.B.: This procedure will not take place during the pilot study.

The cognitive function of the animals will be assessed before and after the surgery at both acute and chronic timepoints.

- Working memory will be evaluated using a Y-maze spontaneous alternation task[9];
- short-term spatial memory and long-term spatial memory will be evaluated using an Object Location Task[9];
- Learning and reference memory will be evaluated using the Barnes Maze test[8] (only chronic timepoint).

Hypoperfused animals show an impaired working memory after cerebral hypoperfusion for 1 month while reference memory is only impaired after cerebral hypoperfusion for 5-6 months[7,8]. The protective or deleterious contribution of microglia cells on the cognitive functions of the animals will be determined in the treated groups.

Perfusion and sacrifice

Treated and non-treated sham/BCAS animals will be perfused and euthanized for the collection of brains that will serve for ex vivo investigations (2D and 3D histology, flow cytometry for the characterization of microglia phenotypes). While in vivo imaging limis the imaging to the first cortical layers of the brain, ex vivo imaging of the whole brains will provide more informations on the impact of cerebral hypoperfusion in deeper areas.

A first series of animals will be perfused and sacrificed at an early timepoint after induction of cerebral hypoperfusion. A second series of animals - imaged in vivo at both acute and chronic timepoints - will be perfused and sacrificed at the late timepoint after in vivo imaging. During the perfusion step, several fluorescent dyes will be injected to assess the integrity of the blood brain barrier.

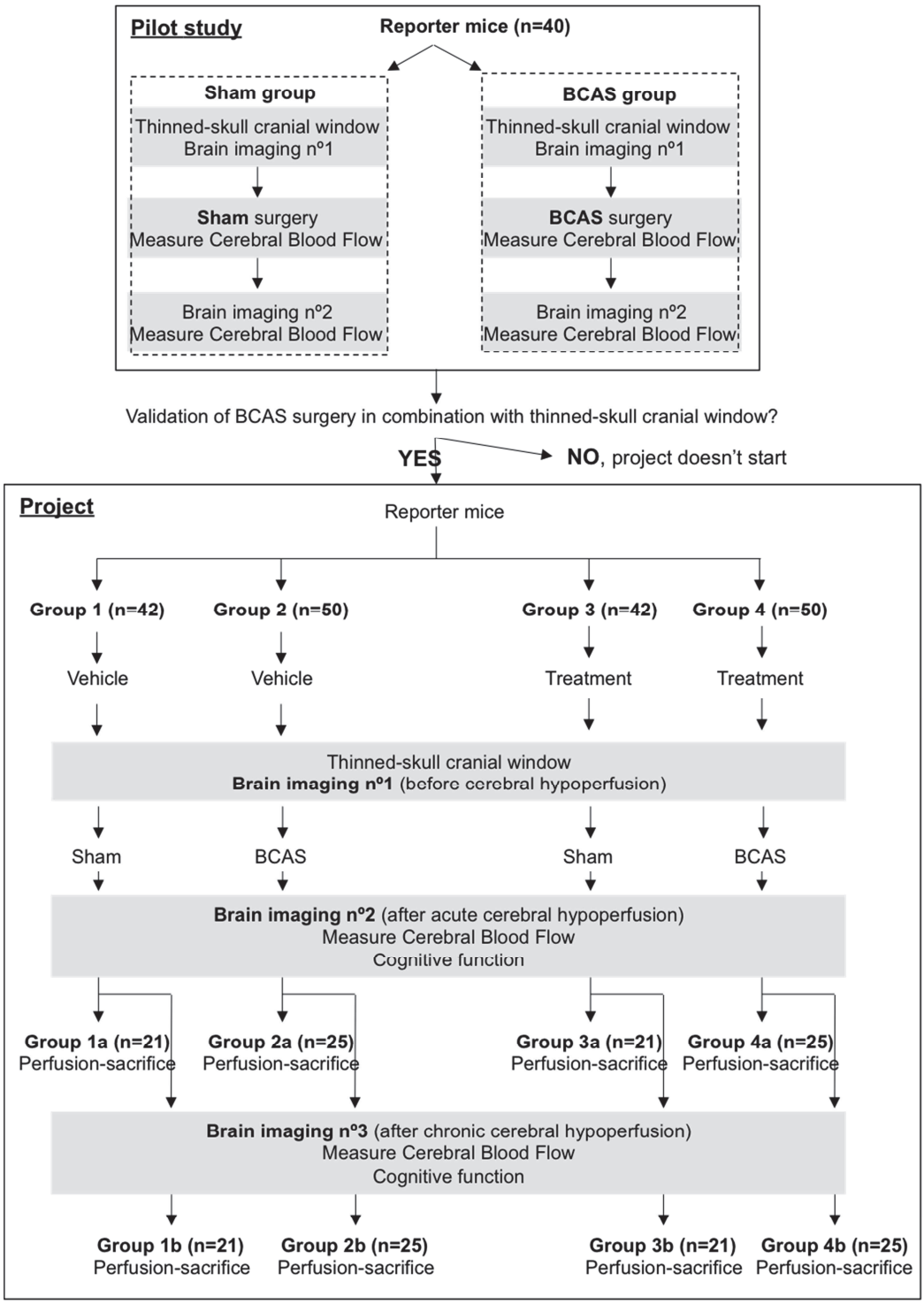


Figure 1: General design of the experimental procedures

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

Total duration

Maximal experiment duration for one animal (chronic hypoperfusion situation): 6 weeks (one week with cranial window prior BCAS surgery, maximum 5 weeks after BCAS surgery).

Animal procedures

All the animal procedures with their respective natures and frequencies are listed in the table below. A short description of the main procedures is described in the table below

Procedure	Nature	Frequency	Justification
Body weight measurement and neurological scoring	Animal handling	1x/week	Animal welfare score sheet and humane endpoint
Drug treatment (see corresponding paragraph, e.g. CSF1R inhibitor[5,6])	Administration of a drug (food or water)	daily	Study the potential protection afforded by the drug
Thinned skull cranial window and TPLSM imaging (see description below the table)	Surgery Imaging	1x 4x	In vivo imaging to study the impact of cerebral hypoperfusion on vascular, microglial and neuronal compartments over time [10]
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)	Surgery	1x	Induction of the pathology (cerebral hypoperfusion) [7,8]
Brain Laser Doppler flowmetry	Imaging	4 x	Assessment of the decrease of cerebral blod flow induced by the BCAS intervention, after surgery and prior to each imaging session. [7]
Y-maze alternation task	Behavioral task	2 x	Assessment of working memory[9,11]
Object Location Task	Behavioral task	2 x 3 trials	Assessment of short and long term spatial memories[9,11]
Barnes Maze test	Behavioral task	4 trials x 5 days	Barnes Maze test[8]
Perfusion and sacrifice	Terminal experimentation	1x	Collection of fixed and non-fixed brains for IHC and flow cytometry respectively

Thinned skull cranial window:

Transcranial two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) imaging of the cortex in living mice is a minimally invasive method, which allows repeated imaging of brain cells and vasculature at high optical resolution over intervals ranging from seconds to months. By creating a thinned-skull cranial window with skull thickness ~20 µm, it is possible to image fluorescently labelled structures located up to 300µm within the cortex using TPLSM. In the past several years, this transcranial imaging approach has been used to study the development and plasticity of synaptic connections, neuronal network activity, cerebral vasculature, amyloid plaques and the structure and function of microglial cells in the living intact cortex [10,12,13]. This is the most suitable technique for chronic in vivo imaging at a high resolution.

Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS)
Under surgical anaesthesia, a midline cervical incision will be performed. Both CCAs will be exposed and freed from their sheaths. The arteries will be gently lifted by sutures and placed between the loops of the microcoils just below the carotid bifurcation. The microcoils will be twined by rotating it around the CCAs. In the sham operation groups, CCAs will be exposed without placing microcoils. This technique has been proven to be effective to induce a moderate reduction of CBF (-30%) with a mortality of 15-20% and a cognitive dysfunction in the operated mice[7,8,14,15].

Y-maze alternation task
Each mouse will be placed in a randomly divided start arm of a Y-maze and allowed to freely explore the arena for 6 min. The number of arm entries and the locomotor activity will be recorded per mouse. A successful alternation, named « a triad », is made if the mouse visits all 3 arms of the maze consecutively. The alternation percentage will be calculated from the number of triads divided by the maximum possible alternations per mouse. This is a standard behavioural task to assess the working memory of rodents.

Object Location Task (OLT)
Short and long-term spatial memory will be tested using the OLT. Briefly, this 2-trial task consists of a learning (T1) and -test trial (T2). In T1 a set of two identical objects will be placed symmetrically in the middle of a circular arena, which can be freely explored for 4 minutes. After a short or long interval period spent in their home cage, the mice will be placed in the arena 4 minutes for T2, while one of the objects (right or left) will be moved to a different location (front or back) and all other stimuli will be kept the same. As rodents are naturally curious, they should spend more time exploring the moved object if they remember the previous location. The time spent exploring either object will be scored. Before the testing session, animals will be habituated to the empty arena, all objects and testing procedures for a period of 1 week. This is a standard behavioural task for the evaluation of both short and long-term spatial memories.

Barnes Maze test
This behavioral task assess the spatial learning and reference memory of the tested mice. It is based on the capabilities of mice to explore and escape through holes. Barnes maze consisted of a circular surface with many holes around the perimeter. An escape tunnel is located beneath one of the holes. After habituation to the experimental setup, mice will be trained to locate a hidden escape tunnel with the aid of visual cues. Mice will perform 4 trials per day for 5 consecutive days. The Barnes maze is similar to the Morris water navigation task, but does not utilize a strong aversive stimulus as reinforcement (stress induced by swimming). Since high levels of stress can influence the animal's performance, the Barnes maze is considered ideal for eliminating stress-induced confounds.

Perfusion and sacrifice
The following procedures will be applied depending on the animal serie:
- serie of animals for immunohistochemistry: under terminal anaesthesia, the animals will receive an i.v. perfusion of fluorescent probes to label the vasculature and assess the blood brain barrier permeability. After termination of the i.v. perfusion of probes, animals will be perfused with fixatives before decapitation and tissue collection;
- serie of animals for flow cytometry and molecular work: blood will be collected from the aorta until cardiac arrest of the animals. Saline solution will then be perfused before decapitation and tissue collection.

- **References are listed at the end of the box/part B.**

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

To determine group size, a statistical power calculation will be performed based on the Sachs' formula $n=2[(\alpha+\beta)^2 \times \sigma^2]/\Delta^2$ (L. Sachs, Angewandte Statistik, Springer, 1983, Berlijn, Springer Verlag). This is to guarantee that the sample size, in the respective experimental setup, will guarantee the detection of a given variation (decided prior). Our calculations will be based on previous own studies and existing publications.
In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,…), thus limiting the total number of animals to be used to achieve the study aims.

B. The animals

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

Species: Mus musculus
Strains: Cx3Cr1$^{GFP/WT}$ x Thy1$^{YFP/0}$ mice resulting from the crossing of Cx3Cr1$^{GFP/GFP}$ (Jackson Laboratory Stock number 005582) and Thy1$^{YFP/0}$ (Jackson Laboratory Stock number 003782) will be used while they are in their adult life stage.

Cx3Cr1$^{GFP/WT}$ have been widely used to follow microglia over time and investigate their contribution in many different pathological conditions [13,16–18], while Thy1$^{YFP/0}$ were used to follow the process of neuronal degeneration over time [16,19–21].

Mice from the 2 strains described above will be crossed to obtain Cx3Cr1$^{GFP/WT}$ x Thy1$^{YFP/0}$. Both separate strains as well as the crossed mice have been already bred locally and don't show any sign of discomfort. These crossed mice will offer thus the possibility to assess the impact of cerebral hypoperfusion on the microglial and neuronal states over time as well as their interplay during the development of the pathology.

Estimated numbers (see table below):

A first group of 40 animals is required for the optimization of the BCAS and cranial window techniques to be used with this animal model (pilot study). This is to ensure the success of the whole study.
The main goal of the pilot study is to implement the BCAS surgery locally. A similar surgical technique on carotids is already mastered locally. Adaptation to the new technique will be guided by external collaborators with expertise with BCAS surgery. This technique will be also tested in combination with the cranial window surgery. The CBF reduction and the survival rate will be analysed and compared to the data from literature.
The success of the pilot study is mandatory to start the study with the experimental groups. The pilot study will be considered successful if :
- the BCAS surgery leads to a reproducible reduction of the cerebral blood flow (-20 to -40%) with a drop-out post-surgery that does not exceed the expectations (approximately 20%);
- both the vasculature/BBB integrity and microglia cells are possible to image with the cranial window performed on the sham/BCAS mice (hypoxic conditions);

For the BCAS experimental groups, taking into account the variability of the different measurements, the success rate of the surgical interventions (80-85%) and the 2 series of animals needed per group to collect fixed (immunohistochemistry of whole brains, 10 mice/group) and non-fixed tissues (flow cytometry on whole brain lysates, 10 mice/group), it can be estimated that a total of 25 animals per BCAS group and per timepoint (a + b) is required ((10+10)/0.8 = 25). For the Sham groups, the expected drop due to surgery being lower (5%), the total number of animals per Sham group and per timepoint is (10+10)/0.95 = 21.
The total number of animals requested for this project is summarized in the table below and is estimated to 224 mice over a period of 3 years.

Group nº	Goal	Surgery	Treatment	Sub-groups	Acute timepoint	Chronic timepoint	Estimated number of animals
Pilot	Optimization	Sham/ BCAS	-		x	x	40
1	Experimental	Sham	Vehicle	1a	x		21
				1b		x	21
2	Experimental	BCAS	Vehicle	2a	x		25
				2b		x	25
3	Experimental	Sham	Treatment	3a	x		21
				3b		x	21
4	Experimental	BCAS	Treatment	4a	x		25
				4b		x	25
	Total estimated number of animals						224

References:

1. Bollinger, J. L., Bergeon Burns, C. M. & Wellman, C. L. Differential effects of stress on microglial cell activation in male and female medial prefrontal cortex. *Brain Behav. Immun.* **52,** 88–97 (2016).
2. Crain, J. M., Nikodemova, M. & Watters, J. J. Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult CNS in male and female mice. *J Neurosci Res* **91,** 1143–1151 (2013).
3. Mirza, M. A., Ritzel, R., Xu, Y., McCullough, L. D. & Liu, F. Sexually dimorphic outcomes and inflammatory responses in hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Neuroinflammation* **12,** 32 (2015).
4. Li, R. & Singh, M. Sex Differences in Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Front Neuroendocrinol* **35,** 385–403 (2014).
5. Elmore, M. R. P. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82,** 380–397 (2014).
6. Dagher, N. N. *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* **12,** 139 (2015).
7. Shibata, M., Ohtani, R., Ihara, M. & Tomimoto, H. White matter lesions and glial activation in a novel mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **35,** 2598–2603 (2004).
8. Nishio, K. *et al.* A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* **41,** 1278–1284 (2010).
9. Sierksma, A. S. R. *et al.* Behavioral and neurobiological effects of prenatal stress exposure in male and female APPswe/PS1dE9 mice. *Neurobiol. Aging* **34,** 319–337 (2013).
10. Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C. N., Grutzendler, J. & Gan, W.-B. Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat Protoc* **5,** 201–208 (2010).
11. Akkerman, S. *et al.* Object recognition testing: methodological considerations on exploration and discrimination measures. *Behav. Brain Res.* **232,** 335–347 (2012).
12. Drew, P. J. *et al.* Chronic optical access through a polished and reinforced thinned skull. *Nat. Methods* **7,** 981–984 (2010).
13. Lou, N. *et al.* Purinergic receptor P2RY12-dependent microglial closure of the injured blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113,** 1074–1079 (2016).
14. Shibata, M. *et al.* Selective impairment of working memory in a mouse model of chronic cerebral hypoperfusion. *Stroke* **38,** 2826–2832 (2007).
15. Gooch, J. & Wilcock, D. M. Animal Models of Vascular Cognitive Impairment and Dementia (VCID). *Cell. Mol. Neurobiol.* **36,** 233–239 (2016).
16. Evans, T. A., Barkauskas, D. S., Myers, J. T. & Huang, A. Y. Intravital Imaging of Axonal Interactions with Microglia and Macrophages in a Mouse Dorsal Column Crush Injury. *Journal of Visualized Experiments* (2014). doi:10.3791/52228
17. Jung, S. *et al.* Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 4106–4114 (2000).
18. Parkhurst, C. N. *et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* **155,** 1596–1609 (2013).
19. Feng, G. *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of

GFP. *Neuron* **28,** 41–51 (2000).
20. Greenberg, M. L. *et al.* Two-photon imaging of remyelination of spinal cord axons by engrafted neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111,** E2349–2355 (2014).
21. Porrero, C., Rubio-Garrido, P., Avendaño, C. & Clascá, F. Mapping of fluorescent protein-expressing neurons and axon pathways in adult and developing Thy1-eYFP-H transgenic mice. *Brain Res.* **1345,** 59–72 (2010).
22. Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F. & Hu, X. J. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* **26,** 627–634; discussion 635 (1995).

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:
Our study focuses on the interplay of 3 cellular compartments over time in presence or absence of a proper cerebral perfusion. There is no in vitro alternative method for this study. In adddition, the cognitive function will also be evaluated to assess the relevance of the study to the clinical situation. The use of an animal model is therefore mandatory to achieve the research aims.

Reduction:
The number of animals required per group is calculated, based on previous own studies and existing publications, to guarantee that the statistical power will be reached with the minimal number of animals.
In addition, several experiments will be carried out on the same animal throughout the study: cognitive tasks, in vivo imaging, ex vivo imaging, flow cytometry of brain cells,…).

Refinement:
The mice to be used are transgenic animals that harbor fluorescent proteins in the cells of interest. This enables tracking of those cells in vivo and a better imaging quality than any staining or labeling technique. Thus the critical steps associated with staining/labelling will be avoided. Those mice will undergo a well-established surgical intervention to induce cerebral hypoperfusion. The BCAS model has been validated in several studies to induce a 30% CBF reduction (microcoils with a diameter of 0.18 mm[7,8]) that is associated with cognitive dysfunction, and is therefore recognized as a relevant animal model for the study of vascular cognitive impairment[15]. The combination of this surgical intervention on the transgenic mice is the perfect combination to achieve the goals of the proposed study. In addition, several parameters will be collected from the same animals, thus allowing to better relate experimental observations within a same animal.

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

An adequate level of anesthesia will be induced to guarantee the absence of suffering during the surgical interventions. In addition, prior and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent suffering during the recovery from surgery.
Animals will be carefully examined throughout the entire duration of the study for the early detection of pain signs.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n.a.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

☒ No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

☒ No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

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

The surgical procedures will be performed under general anaesthesia. The depth of anaesthesia will be monitored regularly by checking the presence of reflexes. Prior and after the surgery, animals will receive analgesics to prevent and relieve the pain associated with the surgery.

Welfare score sheets will be filled in for each animal and will be used throughout the entire duration of the study to ensure that the discomfort of the animals do not exceed the humane endpoints defined for the study (part J).

In summary, the probability of suffering will be minimized by a combination of anesthesia, pain control, optimal housing as well as regular inspection of animal welfare.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1) As a result of the BCAS surgery, animals will exhibit a decreased cognitive function (expected);

2) Possible complications after cranial window surgery or BCAS surgery (e.g. damage to the cranial window caused by the animal: detachment of the dental cement border),;

3) Possible complications due to drug treatment due to an unknown toxicity.

Explain why these effects may emerge.

1) This effect is expected and is part of the pathology studied;

2) This effect might occur following the surgical interventions;

3) Although the treatment will be selected on different criteria including toxicological safety, it is not possible to predict the absence of toxicity in our particular model studied.

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

1) If the severity of the cognitive dysfunction leads to the humane endpoint described below (part J), the animal will be euthanized to avoid unnecessary pain or distress;

2) If a post-surgical complication occurs, its etiology will be investigated (problem during the surgery, infection, a.o.) and a solution will be implemented to avoid future complications.
Surgeries will be performed with sterile tools in an aseptic environment to prevent the occurrence of infections. In case of a skin infection, the wound will be cleaned with an antiseptic and an anti-inflammatory drug will be administrated to limit the associated inflammatory reaction. The infected animal will be monitored carefully and will receive a painkiller drug to avoid unnecessary pain. If the infection can't be controlled, the animal will be euthanized. In case the dental cement border of the cranial window is getting loose or has been detached by the animal, an administration of a painkiller will be done to avoid any unnecessary pain and a new dental cement protection will be created under anaesthesia.

3) If the toxicity observed leads to a discomfort exceeding the moderate discomfort expected for the study and/or if it impairs the interpretation of the data, the treatment will be interrupted and animals will be euthanized if humane endpoints are reached.

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Animals will be inspected regularly to monitor their welfare. The observations (body weight, overall condition, 18-points Garcia neurological score based on locomotor activity and body proprioception) will be registered in an animal welfare score sheet.

The Garcia neurological test will be used weekly to assess eventual motor and behavioral deficits

indicative of major neurological damage such as stroke. In this composite neurological examination, 6 tests are used to provide an overall score from 0 to 18 points maximum[22].

The following criteria will be considered as humane endpoints:

- a weight loss of >20% per week associated with an overall decrease of the general condition (decreased food intake, feces production and water consumption). N.B.: Following BCAS surgery, a temporary weight loss is expected during the first week as previously described[7];
- a Garcia score ≤ 10 (reflecting an overall moderate (sub-normal) score for all parameters) will reflect a severe alteration of behaviour and locomotor activity due to a major cerebral injury.

Animals fulfilling one of these criteriae will be immediately euthanized to avoid any unnecessary stress and pain using a CO2-euthanasia system.

Indicate the likely incidence.

The expected incidence is low (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').

Procedure	**Expected level of discomfort (overall % of animals impacted)**
Animal handling, and body weight measurement	mild (100%)
Drug treatment (water or food)	mild (50% - 3a, 3b, 4a, 4b)
Thinned skull cranial window surgery & imaging	mild (100%)
Bilateral Carotid Artery Stenosis (BCAS) or Sham	moderate (100%)
Consequences of BCAS	moderate (50% - Pilot, 2a, 2b, 4a, 4b)
Brain laser Doppler flowmetry (LDF)	mild (100%)
Y-maze alternation task	mild (100%)
Object Location Task (OLT)	mild (100%)
Barnes maze test	mild (50% - 1b,2b,3b,4b)
Cumulative discomfort – Pilot study	**moderate**
Cumulative discomfort - Experiment	**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.

The study required analysis of brains post-mortem.

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

11.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
[redacted]
Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT

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
AVD1070020172885
Bijlagen
1

Datum 11 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 7 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation" met aanvraagnummer AVD1070020172885. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij vragen gesteld over het ongerief en de NTS. Bij uw antwoord heeft uw een aangepast projectvoorstel en een aangepaste bijlage beschrijving dierproeven en NTS meegestuurd.

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 "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation" starten. De vergunning wordt afgegeven van 11 september 2017 tot en met 1 september 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[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:	Universiteit Maastricht
Adres:	Postbus 616
Postcode en plaats:	6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer:	10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 11 september 2017 tot en met 1 september 2020, voor het project "Cerebral hypoperfusion and neuroinflammation" met aanvraagnummer AVD1070020172885, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC UM. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 augustus 2017, ontvangen op 7 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 23 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Hypoperfusion, cognitive function and brain imaging				
	Muizen (Mus musculus) /	224	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.

Aanvraagnummer:
AVD1070020172885

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD1070020172885

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen
Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.
Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister een ontheffing is verleend.

Verzorging
De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.
In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

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

kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef
Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.
Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.
Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.
In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.
De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

1 1 AUG 2017

Centrale Commissie Dierproeven

1.

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 10800

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	30275924

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

Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	
Postbus	12007	
Postcode en plaats	3501AA	Utrecht
IBAN	NL27INGB0000425267	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 10 - 2017
		Einddatum	1 - 10 - 2020
3.2	Wat is de titel van het project?	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege

☐ Wijziging € Lege

4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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

Datum

Handtekening

Centrale Commissie Dierproeven

2.

Format
Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul de titel van het project in.	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In de pluimvee industrie wordt bescherming tegen infectieziekten nagestreefd door middel van vaccinatie

en het gebruik van medicijnen in het voer. Het gebruik van deze medicijnen wordt meer en meer aan banden gelegd, omdat dit kan leiden tot resistentie tegen antibiotica. Hoewel antibiotica zelf niet direct een antiviraal effect hebben, kunnen ze wel een rol spelen in het ziekteverloop na een virale infectie.
Omdat het gebruik van medicijnen in voer steeds minder wordt toegestaan, worden effectieve vaccins die de afweer verbeteren steeds belangrijker om kippen te beschermen tegen virale en bacteriële infecties. Dit is zowel voor leghennen als vleeskippen van belang. Beide worden veelvuldig gevaccineerd in de eerste weken van hun leven. Omdat vleeskippen relatief kort leven in vergelijking met leghennen, is het verbeteren van de afweer op de lange termijn vooral belangrijk voor leghennen die herhaaldelijk gevaccineerd moeten worden.
Om effectieve vaccins te ontwerpen is het van essentieel belang om te begrijpen hoe het afweersysteem pathogenen bestrijdt. Het afweersysteem bestaat uit twee delen, het innate (oftewel het aangeboren) en het adaptieve afweersysteem. De innate afweer vormt de eerste verdedigingslinie tegen binnendringende pathogenen en wordt binnen enkele uren aangezet. Het adaptieve afweersysteem komt pas na 5-7 dagen op gang en zorgt voor de vorming van antistoffen en T cellen die specifiek zijn voor het desbetreffende pathogeen.
Huidige vaccins zijn vooral gericht op het versterken van het adaptieve deel van het afweer systeem. Een voordeel van het versterken van de innate afweer is dat op deze manier de eerste verdedigingslinie direct versterkt wordt. Het stimuleren van het adaptieve afweersysteem leidt tot pathogeen specifieke responsen die langer standhouden, maar die ook meer tijd nodig hebben om te ontstaan. Hierdoor heeft het pathogeen meer gelegenheid om zich te vermenigvuldigen en schade toe te brengen aan de gastheer.
Een belangrijke component van het innate afweersysteem is de zogenaamde "natural killer" (NK) cel. Deze killer cellen zijn in staat om virus geïnfecteerde cellen te doden en spelen dan ook een belangrijke rol in de eerste afweer reactie nadat een virus de gastheer binnenkomt. Virussen kunnen deze NK cellen op verschillende manieren aanzetten. Een manier is door binding van virale eiwitten aan activerende receptoren op het oppervlak van de NK cel, wat leidt tot NK cel activatie. Voorbeelden van liganden voor activerende NK cel receptoren in de mens zijn virale eiwitten zoals het haemagglutinine eiwit van het influenza virus [1, 2]en het pp65 eiwit van cytomegalovirus[3] . Ook in de kip kan bestaan dergelijke receptoren. We hebben recentelijk aangetoond dat binding van het vogelgriep virus aan activerende NK cel receptoren in de kip inderdaad leidt tot NK cel activatie[4]. Daarnaast kunnen cytokines die gemaakt worden door andere cellen van het innate afweersysteem zoals IL-12 en IFNα/b NK cellen aanzetten (reviewed in[5]).
Een belangrijke functie van geactiveerde NK cellen is het doden van virus geïnfecteerde cellen. Daarnaast zijn NK cellen belangrijk in het initiëren van de adaptieve afweer respons die vervolgens op gang komt. NK cellen kunnen zowel een direct effect als een indirect effect hebben op de ontwikkeling van de specifieke afweer reactie. NK cellen produceren cytokinen zoals IFNγ en IL-10[6]–die een direct effect hebben op T cellen[7]. Daarnaast kunnen NK cellen kunnen de specifieke afweer op een indirecte manier beïnvloeden door een interactie met zogenaamde dendritische cellen[8] die dan op hun beurt de T cellen activeren.

Er is nog weinig bekend over NK cellen in de kip. Enkele jaren geleden zijn door onze groep een aantal technieken opgezet waarmee de aanwezigheid en het functioneren van deze cellen gemeten kan worden[9]. Met behulp van deze technieken is de NK cel activiteit na infectie met verschillende pluimvee virussen onderzocht. Er is aangetoond dat de activiteit van NK cellen in de long verhoogd is na infectie met een mild vogelgriep virus. Infectie met hoog pathogene H5N1 virussen resulteerde daarentegen in een verlaagde NK cel activiteit[10]. Ook na infectie met het respiratoire Infectious Bronchitis Virus (IBV) is de activiteit van long NK cellen verhoogd[11]. Verschillende virussen zijn dus in staat om NK cellen in de kip te activeren.
Hoe en waar de virussen de kippen NK cellen aanzetten is nog niet duidelijk. Ook is niet bekend of NK cellen uitsluitend geactiveerd worden door levende virussen, of dat ook (geïnactiveerde) vaccin stammen leiden tot een verhoogde NK cel activiteit. Daarnaast is het de vraag of verschillende virussen variëren in hun strategie om NK cellen aan te zetten, of dat er een uniform mechanisme is waardoor de NK cel wordt aangezet tijdens een virale infectie.
In dit project zal de NK activiteit bestudeerd worden na infectie met verschillende pluimvee virussen en na vaccinatie met verschillende pluimvee vaccins. De focus zal liggen op twee economisch relevante

pluimvee virussen nl het respiratoire virus IBV en Marek's Disease Virus (MDV), een kippen herpesvirus. Eerdere studies hebben een verhoogde activiteit van long NK cellen laten zien na infectie met IBV M41. Het is niet duidelijk of deze verhoging ook optreedt na infectie met een andere IBV stam of na vaccinatie.

In vitro tests laten een verhoogde NK cel activiteit zien wanneer NK cellen 24 uur lang gekweekt zijn in aanwezigheid van MDV. Dit suggereert dat MDV in staat is om ook *in vivo* NK cellen te activeren. De vaccin stam induceerde een milde verhoging van de NK activiteit *in vitro* en de NK activiteit nam meer toe na incubatie met het virus RB-1B. *In vitro* onderzoek met IBV heeft ook plaatsgevonden, maar tot op heden is het niet gelukt om NK geïsoleerd uit kippen cellen te activeren door een co-kweek met IBV. Dit is in tegenstelling tot de *in vivo* experimenten die wel een verhoogde NK activiteit laten zien[11]
Het doel van deze experimenten is
1. om de NK cel activiteit na infectie met deze twee pluimvee virussen te bestuderen om zo meer te leren over hoe verschillende virussen NK cellen aanzetten
2. om vast te stellen of er verschil is in NK cel activatie na infectie versus vaccinatie.

Op dit moment is het niet mogelijk is om *in vivo* NK studies in de kip te vervangen door *in vitro* experimenten. Het is totaal niet duidelijk hoe het *in vitro* werk zich verhoudt tot wat er *in vivo* gebeurt. Als een embryonale NK cel reageert in een *in vitro* assays, zegt dat niks over wat een long NK cel gaat doen na een respiratoire infectie. Het doel van deze aanvraag is juist om beter te gaan begrijpen hoe virussen NK cellen activeren, zodat het in de toekomst mogelijk is om *in vivo* proeven gedeeltelijk te vervangen *door in vitro* werk.
Ook bevat deze aanvraag naast levende virussen studies met vaccins. Wanneer deze experimenten laten zien dat virussen en vaccins een vergelijkbaar effect hebben op de kippen NK cellen, kunnen in de toekomt vaccins gebruikt worden in eventuele *in vivo* proeven om zo het ongerief van de dieren te verminderen.

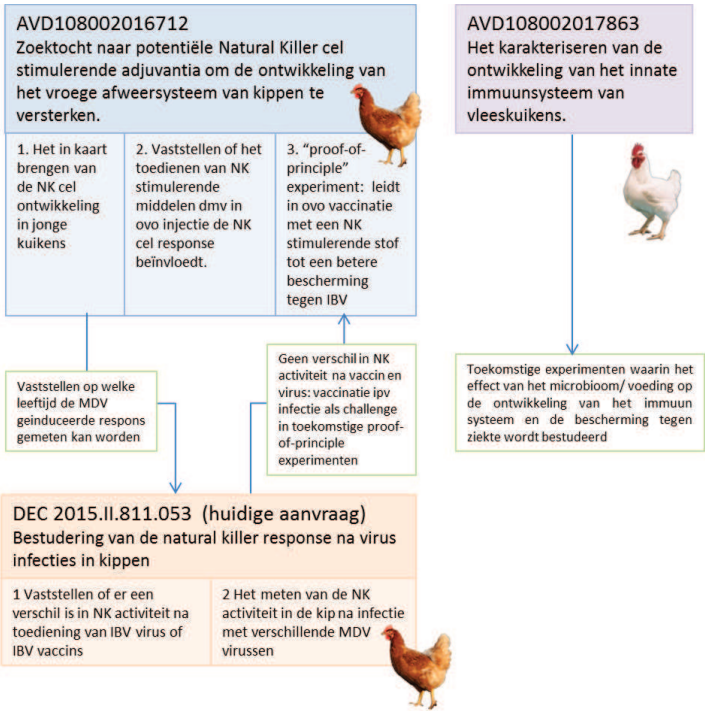
IBV
Het coronavirus IBV is een ernstig probleem voor de pluimvee industrie. Besmetting kan leiden tot luchtweginfecties en verhoogde gevoeligheid voor *E.coli*, nier problemen en een verminderde ei kwaliteit. In eerdere studies is aangetoond dat infectie met IBV-M41 leidt tot een verhoogde NK cel activiteit in de long[12]. Het mechanisme achter deze IBV geïnduceerde NK activiteit is nog niet duidelijk. Een mogelijkheid is dat IBV aan een NK cel receptor bindt waardoor de NK cel wordt aangezet zoals beschreven is voor aviaire influenza[4]. Een andere mogelijkheid is dat het virus epitheel cellen infecteert wat uiteindelijk leidt tot de productie van signaalstoffen die op hun beurt de NK cellen activeren. Wanneer herkenning door NK cellen essentieel is voor de NK cel activiteit, zullen zowel levende virussen als (dode) vaccins NK cellen kunnen aanzetten. Wanneer er infectie van cellen nodig is, zal een vaccin geen NK activiteit induceren. Dus door de NK activiteit te meten in kippen die besmet zijn met verschillende IBV virussen of IBV vaccins kan worden vastgesteld of IBV vaccins en levend virus een vergelijkbare NK response induceren. Deze informatie leidt tot meer inzicht in het mechanisme achter de IBV geïnduceerde NK cel activiteit maar is ook belangrijk voor eventuele dierproeven in de toekomst. Wanneer IBV vaccinatie en IBV infectie hetzelfde resultaat laten zien, kan in de toekomst IBV vaccinatie gebruikt worden als alternatief voor IBV infecties wat leidt tot minder ongerief voor de dieren.

MDV
Marek's Disease virus (MDV) is een zeer besmettelijke ziekte in pluimvee die wordt veroorzaakt door het oncogene αherpesvirus Marek's Disease Virus (MDV). Er bestaan vaccins tegen MDV. Deze vaccins zijn zeer effectief in het bestrijden van de ziekte (tumorvorming) maar beschermen niet tegen infectie en replicatie van het virus. Hierdoor worden de MDV virussen stapsgewijs steeds virulenter waardoor op termijn de huidige vaccins niet meer voldoende bescherming zullen bieden. MDV zorgt voor tumor vorming in viceral organs, verlammingsverschijnselen maar onderdrukt ook het afweer systeem (zogenaamde immuun suppressie). Als gevolg hiervan worden de kippen gevoeliger voor andere infectieuze agentia zoals *E.coli* en is de response op vaccins tegen andere ziekteverwekkers zoals IBV en Mycoplasma synoviae minder goed[12]. Ook MDV vaccins zoals CVI988 zijn in staat om het afweer systeem te onderdrukken.

Binnen het ERA-NET ANIHWA project MADISUP wordt met partners in Duitsland, Frankrijk en Groot Brittannië onderzoek gedaan naar de tijdelijke onderdrukking van het immuunsysteem als gevolg van MDV. Het doel is om aan de ene kant te zoeken naar cellulaire mechanismen die ervoor zorgen dat MDV het afweer systeem onderdrukt, en aan de andere kant om nieuwe vaccins te ontwerpen die het immuunsysteem niet onderdrukken maar die wel zorgen voor bescherming tegen MDV veldstammen.

Onze bijdrage in dit project bestaat uit het onderzoeken van de NK cel response na MDV infectie. Experimenten in het lab met embryonale NK cellen en MDV geïnfecteerde cellen hebben een verhoogde NK activiteit laten zien in vergelijking met niet geïnfecteerde cellen. Dit suggereert dat MDV in staat is om NK cellen te activeren. Een studie uit de jaren 80 heeft beschreven dat de NK activiteit in MDV resistente en gevaccineerde kippen verhoogd is terwijl MDV gevoelige kippen een verlaagde NK cel activiteit laten zien[13]. Het mechanisme hierachter is tot op heden niet bekend. Daarnaast is het niet bekend of NK cellen betrokken zijn bij de onderdrukking van het afweersysteem na MDV infectie. Door met de huidige technieken de NK activiteit na infectie met virulente en MDV vaccin stammen te analyseren kan zowel het directe antivirale effect van NK cellen als de productie van cytokines die andere cellen van het adaptieve immuunsysteem aan zetten bestudeerd worden. Op deze manier kan 1. de rol van NK cellen na MDV infectie beter in kaart worden gebracht en 2. worden onderzocht of de NK cel response betrokken is bij de onderdrukking van het afweer systeem na MDV infectie.

Het bestuderen van de NK activiteit na IBV en MDV infectie zal leiden tot nieuwe kennis over de virus specifieke vroege afweer response. Door de NK activiteit na infectie met deze verschillende wild type virussen en de bijbehorende vaccin stammen te bestuderen kan worden vastgesteld of deze virussen/ vaccins een vergelijkbare strategie hebben om NK cellen te activeren.



Figuur 1. Relatie tussen de huidige CCD aanvraag en eerder (goedgekeurde) CCD aanvragen van de onderzoeksgroep

Referenties

1. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature 409(0028-0836; 6823):1055-1060

2. Glasner A, Zurunic A, Meningher T, Lenac Rovis T, Tsukerman P, Bar-On Y, Yamin R, Meyers AF, Mandeboim M, Jonjic S, Mandelboim O (2012) Elucidating the mechanisms of influenza virus recognition by Ncr1. PLoS One 7(5):e36837

3. Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E, Porgador A, Honigman A, Plachter B, Mevorach D, Wolf DG, Mandelboim O (2005) Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. Nat Immunol 6(5):515-523
4. Jansen CA, van Haarlem DA, Sperling B, van Kooten PJ, de Vries E, Viertlboeck BC, Vervelde L, Gobel TW (2016) Identification of an Activating Chicken Ig-like Receptor Recognizing Avian Influenza Viruses. J Immunol 197(12):4696-4703
5. Zwirner NW, Domaica CI (2010) Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. Biofactors 36(4):274-288
6. Lee SH, Kim KS, Fodil-Cornu N, Vidal SM, Biron CA (2009) Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. J Exp Med 206(10):2235-2251
7. Raulet DH (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. Nat Immunol 5(10):996-1002
8. Andoniou CE, van Dommelen SL, Voigt V, Andrews DM, Brizard G, Asselin-Paturel C, Delale T, Stacey KJ, Trinchieri G, Degli-Esposti MA (2005) Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. Nat Immunol 6(10):1011-1019
9. Jansen CA, van de Haar PM, van Haarlem D, van Kooten P, de Wit S, van Eden W, Viertlbock BC, Gobel TW, Vervelde L (2010) Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. Dev Comp Immunol 34(7):759-767
10. Jansen CA, de Geus ED, van Haarlem DA, van de Haar PM, Londt BZ, Graham SP, Gobel TW, van Eden W, Brookes SM, Vervelde L (2013) Differential lung NK cell responses in avian influenza virus infected chickens correlate with pathogenicity. Sci Rep 3:2478
11. Vervelde L, Matthijs MG, van Haarlem DA, de Wit JJ, Jansen CA (2012) Rapid NK-cell activation in chicken after infection with infectious bronchitis virus M41. Vet Immunol Immunopathol
12. Friedman A, Shalem-Meilin E, Heller ED (1992) Marek's disease vaccines cause temporary U-lymphocyte dysfunction and reduced resistance to infection in chicks. Avian Pathol 21(4):621-631
13. Sharma JM (1981) Natural killer cell activity in chickens exposed to Marek's disease virus: inhibition of activity in susceptible chickens and enhancement of activity in resistant and vaccinated chickens. Avian Dis 25(4):882-893

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

1. Vast te stellen of er een verschil is in NK activiteit na toediening van IBV virus of IBV vaccins
2. De NK activiteit in de kip na infectie met verschillende MDV virussen (vaccin stam virulente stam, mutante virussen waarin enkele virale eiwitten zijn uitgezet) te bepalen.

De onderzoekslijn naar kippen NK cellen is opgezet in 2007. Op dit moment is dit een van de belangrijkste onderzoeklijnen in de aviaire immunologie groep. Na het ontwikkelen van testen om de aanwezigheid en de activiteit van NK cellen te meten[9] zijn deze technieken in verschillende studies toegepast. In deze studies is de rol van NK cellen tijdens infecties met virussen zoals IBV en vogelgriepvirus bestudeerd[10, 11]. Er wordt nauw samengewerkt met een onderzoeksgroep uit München die al meer dan 30 jaar onderzoek doet naar kippen NK cellen en naar NK cel receptoren. Het onderzoek naar MDV wordt uitgevoerd in nauwe samenwerking met onderzoeksgroepen in Duitsland en de UK die veel expertise hebben op het gebied van MDV.

3.3 Belang

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

Kennis op het gebied van NK cel biologie in de kip is beperkt. Deze studie zal bijdragen aan meer inzicht

in hoe virussen NK cellen activeren en wat de geactiveerde NK cellen vervolgens gaan doen. De pluimvee virussen waar in dit project mee gewerkt zal worden (MDV, IBV) hebben enorme economische gevolgen voor de pluimvee industrie. Meer kennis over hoe deze virussen het vroege afweer systeem aanzetten kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins.
Daarnaast kan de kennis over de NK response in de kip na infectie met deze pluimvee virussen leiden tot een beter begrip van de antivirale immuun response in mensen. IBV heeft veel overeenkomsten met het humane severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS). Het oncogene herpesvirus MDV lijkt sterk op het Eppstein-Barr virus wat voor grote problemen zorgt in mensen met een verzwakt afweer system zoals transplantatie patiënten. Daarnaast wordt MDV gebruikt als vector voor recombinante vaccins. Dus effectieve strategieën tegen deze pluimvee virussen kunnen ook van belang zijn voor de humane vaccin industrie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Aanpak:

1. Leghennen worden geïnfecteerd met virus
2. op verschillende tijdpunten na infectie worden de kippen doodgemaakt. Relevante organen worden verzameld.
3. op het lab worden NK cellen geïsoleerd en wordt de NK cel response gemeten

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

IBV
Om de IBV-specifieke NK cellen te bestuderen zullen drie weken oude leghennen geinfecteerd worden met levend IBV virus of worden gevaccineerd. Op verschillende tijdpunten na infectie zullen de longen, milt en bloed worden verzameld voor de isolatie van leukocyten. In het lab zal de aanwezigheid en de activiteit van de NK cellen gemeten worden met behulp van flow cytometry. De hoeveelheid virus in de longen zal worden bepaald door middel van qPCR.

MDV
1 week oude SPF leghennen zullen worden geinfecteerd met MDV vaccin, of verschillende MDV virussen. Doorgaans worden 1 dag oude leghennen geinfecteerd met MDV omdat deze zeer gevoelig zijn voor het virus. Eerder onderzoek waarin de ontwikkeling van de NK cel response in leghennen bestudeerd is (AVD108002016712) heeft echter laten zien dat in deze zeer jonge kuikens de hoeveelheid NK cellen in ed verschillende organen zeer laag is. Hierdoor is het niet mogelijk is om voldoende NK cellen te isoleren voor de analyse. In overleg met professor [redacted] die wekelijks dit soort *in vivo* experimenten doet is ervoor gekozen om 1 week oude leghennen te gebruiken en de dosis virus te verhogen.

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 overeenkomst tussen alle experimenten is de isolatie van de NK cellen. Omdat het om verschillende virussen en vaccins gaat, zullen ze allemaal onderzocht worden. Wanneer een IBV vaccin geen NK cel activiteit induceert, hoeft dat niet te betekenen dat een MDV vaccin ook geen NK cellen aanzet.

Milestone 1: het bestuderen van de NK cel activiteit na infectie met IBV
Milestone 2: het bestuderen van de NK cel activiteit na vaccinatie met IBV
Milestone 3: het bestuderen van de NK cel activiteit na infectie met MDV
Milestone 4: het bestuderen van de NK cel activiteit na vaccinatie met MDV

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

Volgnummer	Type dierproef
1	IBV infectie en vaccinatie
2	MDV infectie en vaccinatie
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	Bestudering van de natural killer response na virusinfecties in kippen
1.2	Looptijd van het project	1 september 2017- 1 september 2020
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	kippen, virusinfectie, natural killer cel, afweer

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)

De pluimveeindustrie probeert virusinfecties bij kuikens vooral te voorkomen door vaccinatie van de kuikens en door medicijnen aan het voer toe te voegen. Het is van groot belang verstandig met deze medicijnen om te gaan, vanwege het gevaar voor antibioticaresistentie. Daarom onderzoeken we betere manieren om kuikens te beschermen tegen infectieziektes. Wanneer virale infecties beter onder controle zijn, zullen er minder bacteriële infecties optreden en is er dus minder antibiotica gebruik nodig om deze secundaire infecties te bestrijden.
Het doel van dit project is om activiteit van kippen NK–cellen (natural killer-cellen) te bestuderen nadat de kippen besmet zijn met een virus. NK-cellen hebben als belangrijkste taak het doden van cellen die besmet zijn met een virus. Daarnaast zetten ze ook de vervolgreactie van het afweer system in

		gang. In eerdere studies hebben we aangetoond dat milde luchtweginfecties in kippen ervoor zorgen dat de NK cellen in de longen worden geactiveerd. Hoe de virussen de NK cellen aanzetten is nog niet bekend. Wanneer we beter begrijpen hoe virussen NK cellen activeren, kunnen we strategieën gaan ontwikkelen om de NK cel te sturen en op deze manier kuikens beter te beschermen tegen infectieziekten. Het doel van dit project is om te onderzoeken hoe twee verschillende virussen en daarvan afgeleide vaccins NK cellen activeren en antwoord te krijgen op de vraag of deze virussen en vaccins eenzelfde manier gebruiken om NK cellen te activeren of dat elk virus zijn eigen specifieke methode heeft. In dit project zal de NK cel response bestudeerd worden na een luchtweginfectie in kippen en na infectie met een kippen herpesvirus.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	We verwachten de eigenschappen van de NK na infecties met de verschillende pluimvee virussen en na vaccinatie met vaccins voor deze virussen in kaart te kunnen brengen. Het verschil in NK activiteit na infecties versus vaccinatie zal aantonen of ook verzwakte virussen (vaccins) in staat zijn om NK cellen te activeren. Dit is belangrijk voor toekomstig onderzoek, als vaccins een vergelijkbare NK celactiviteit kunnen induceren als levende virussen, kunnen in de toekomst kippen gevaccineerd worden in plaats van geïnfecteerd wat leidt tot minder ongerief bij de dieren. Wanneer duidelijk wordt of verschillende virussen eenzelfde of juist verschillende methodes gebruiken om NK cellen te activeren kan deze kennis worden toegepast in de ontwikkeling van strategieën om NK cellen zo te activeren dat ze nog beter in staat zijn om virussen te bestrijden en op deze manier kippen te beschermen tegen een virusinfectie. De pluimvee virussen waar in dit project mee gewerkt zal worden (MDV, IBV) hebben enorme economische gevolgen voor de pluimvee industrie. Meer kennis over hoe deze virussen het vroege afweersysteem aanzetten kan leiden tot de ontwikkeling van nieuwe vaccins. Daarnaast kan de kennis over de NK response in de kip na infectie met deze pluimvee virussen leiden tot een beter begrip van de antivirale immuun response in mensen. IBV heeft veel overeenkomsten met het humane severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS). Het oncogene herpesvirus MDV lijkt sterk op het Eppstein-Barr virus wat voor grote problemen zorgt in mensen met een verzwakt afweersystem, zoals transplantatie patiënten. Daarnaast wordt MDV gebruikt als vector voor recombinante vaccins. Dus effectieve strategieën tegen deze pluimvee virussen kunnen ook van belang zijn voor de humane vaccin industrie.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Legkipkuikens; 205
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Een deel van de kippen wordt geïnfecteerd met een virus dat luchtweginfecties veroorzaakt. Als gevolg van de toediening van het virus dat, behalve de toediening, geen ziekteverschijnselen veroorzaakt, kunnen de kippen het gedurende enkele minuten wat benauwd hebben en ziekteverschijnselen zoals kuchen en rochelen vertonen.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Dierproef 1 (80 kuikens): 75% licht, 25% matig ongerief Dierproef 2 (125 kuikens): 100% licht ongerief

3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De kippen worden doodgemaakt om de organen die relevant zijn voor het afweersysteem te kunnen bestuderen. Het is niet mogelijk om deze organen uit levende dieren te halen.

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.	Voor onderzoek naar het afweersysteem is het noodzakelijk om cellen te gebruiken die kort daarvoor uit het dier zijn gehaald. Er zijn computerprogramma's waarmee we meer kennis op het gebied van het afweersysteem kunnen verkrijgen, maar deze zijn er niet voor het afweersysteem van de kip. Vandaar dat voor onderzoek naar de functie van de afweercellen van de kip het nog steeds noodzakelijk is om materiaal te gebruiken uit dieren.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Op basis van eerdere studies deze is berekend hoe groot de groepen moeten zijn om in dit project een effect van luchtweginfecties stoffen op de NK activiteit te kunnen meten. Op basis van deze data en een studie uit de literatuur is een schatting gemaakt van de groepsgrootte voor experimenten met het kippen herpesvirus. Op deze manier worden zo min mogelijk dieren gebruikt.
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.	We maken gebruik van legkippen, omdat dit de kippen zijn die ook gehouden worden in de pluimvee industrie. Op een commercieel pluimvee bedrijf worden deze dieren herhaaldelijk gevaccineerd in de eerste weken van hun leven, dus dit zijn de dieren waarvoor nieuwe strategieën om kuikens te beschermen tegen infectieziekten het meest relevant zijn.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	De kippen worden gehuisvest op rubberen roosters en krijgen warmtelampen om ervoor te zorgen dat ze het warm genoeg hebben. Voer- en lichtregimes worden toegepast zoals ook van toepassing in een commerciële setting. Dagelijks worden de kippen gecontroleerd op welzijn. Kippen worden gedood indien ziekteverschijnselen worden geconstateerd die duiden op ernstig 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.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3.4.4.1 Type dierproef: Bestuderen van de IBV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Drie weken oude leghennen worden geïnfecteerd met IBV-M41, of gevaccineerd met de IBV vaccins H52 of H120. Op 1, 2 en 4 dagen na infectie/ vaccinatie worden de kippen doodgemaakt, relevante organen zoals long, milt en bloed worden verzameld. In het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek.
De keuze voor de tijdspunten waarop de kippen gedood worden is bepaald nav eerdere experimenten met IBV-M41 waarin er een verhoogde NK cel activiteit in de long optreedt op 1 dag na infectie, op dag 2 neemt de NK cel activiteit af en op dag 4 is de verhoogde NK cel activiteit niet meer aanwezig (Vervelde *et al*, Vet Immunol Immunopathol 2013). Voor levend M41 zou meten op dag 1 en dag 4 voldoende zijn gebaseerd op eerdere resultaten, omdat het effect van IBV vaccinatie op NK activiteit niet eerder is bestudeerd wordt dag 2 ook meegenomen zodat ook de kinetiek van de vaccin geïnduceerde NK response bestudeerd kan worden.
Primaire uitkomst parameters:

- De frequentie van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen
- De activiteit van NK cellen (bepaling van de expressie van CD107, een eiwit wat op de buitenkant van geactiveerde NK cellen zit; productie van IFNγ.)

Secundaire uitkomstparameters: cytokines (IFNα/β/γ), virale load.

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.

!8 dagen bebroede eieren worden gekocht en verder uitgebroed in de broedmachines. Op dag 21 komen de kuikens uit het ei. De kuikens worden vervolgens in

isolatoren gehuisvest en op dag 21 wordt virus of vaccin toegediend dmv intratracheale (i.t.) en intra-nasale(i.t.) toediening, dit duurt ongeveer 5 minuten per kip De toediening gebeurt zowel intra-tracheaal als intra-nasaal om ervoor te zorgen dat er voldoende virus of vaccin aanwezig is.-Op verschillende tijdstippen worden de kippen doodgemaakt door elektrische bedwelming gevolgd door verbloeding.

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

Het effect van IBV infectie op de NK activiteit eerder beschreven (Vervelde *et al*, Vet Immunol Immunopathol 2013).
Op basis van resultaten uit deze studie kan de groepsgrootte berekend worden:
Controle groep 2.7% geactiveerde NK cellen, IBV geïnfecteerde groep 13.9% geactiveerde NK cellen met een SD van resp 0.9% en 3.3% (beide uitkomst variabelen continu). In combinatie met een onderscheidend vermogen van 90% en een alfa van 5% komt de groepsgrootte op n=5, dus 5 kippen per groep.

Per behandeling is er een dag 0 (moment voor infectie), dag 1, dag 2 en dag 4 na infectie dus 4 tijdstippen x5 dieren is 20 dieren

Groep 1: PBS
Groep 2: IBV M41
Groep 3: IBV vaccin H52
Groep 4: IBV vaccin H120

Vier behandelingsgroepen x 20 dieren is 80 kippen

B. De dieren

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

80 leghenkuikens afkomstig van een commerciële broerderij. Er is gekozen voor het gebruik van kippen die ook in de praktijk gebruikt worden zodat er zo dicht mogelijk bij de praktijk situatie gebleven wordt. Er is voor leghennen gekozen omdat de lange termijn verbetering van de afweer response waar we in dit project aan gewerkt wordt mn van belang is voor leghennen aangezien vleeskuikens maar kort leven.

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:
Voor het testen van de activiteit van het vroege afweer systeem is het noodzakelijk om cellen vers uit een dier te verkrijgen. Inzicht verkrijgen in immuun responsen kan deels middels computermodellen, echter voor de kip zijn computermodellen van immuun responsen nog niet beschikbaar. Het meten van de daadwerkelijk functionele activiteit dient nog steeds getest te worden met levende cellen.

Voor IBV zijn alle vaccin en virusstammen uit de aanvraag relevant voor de praktijk. IBV is een respiratoir

virus in pluimvee. Het virus infecteert de epitheliale cellen van de bovenste luchtwegen en afhankelijk van het tropisme ook epitheel cellen van nieren en oviduct.
In het verleden is door ons *in vivo* onderzoek gedaan naar de NK response na infectie met de IBV veldstam M41. Dit resulteerde in de bevinding dat de NK cel response in de longen verhoogd is na IBV infectie.

Nu is de onderzoeksvraag of IBV vaccins in staat zijn om eenzelfde activiteit in long NK cellen te induceren als de veldstam M41. Het is niet mogelijk om deze vraag uitsluitend met testen in het lab te beantwoorden, omdat het technisch niet mogelijk is om epitheliale cellen van de luchtwegen uit een kip te isoleren, te kweken en te infecteren met IBV. Ook is het niet duidelijk welke populatie NK cellen uit de kip gehaald zouden moeten om de IBV geïnduceerde activiteit van long NK cellen te kunnen meten.

Er zijn experimenten gedaan waarin geprobeerd is om long NK cellen te activeren door deze te kweken in de aanwezigheid van virus maar dit is nooit gelukt. Dit is dus in tegenstelling met de verhoogde NK activiteit in kippen een dag na IBV infectie.

Vermindering:
De groepsgrootte is bepaald op basis van eerdere studies met levens IBV in kippen.

Verfijning:
De dieren worden in een groep gehuisvest, onder een warmtelamp en hebben onbeperkt toegang tot voedsel en water

De leghen is het doeldier binnen dit project, waardoor de uitkomsten makkelijk vertaalbaar zijn naar de uiteindelijke toepassing in de praktijk.

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.

1.De dieren worden in groepen gehouden in een omgeving die in ieder geval aansluit bij hun basisbehoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel, voer en watervoorziening.
2. Het welzijn en de gezondheid van de dieren wordt elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie..

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

kortdurende benauwdheid (minder dan 30 sec) als gevolg van intratracheale inoculatie; niezen, proesten, lichte benauwdheid.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

intratracheale toediening van het virus kan een kortdurende benauwdheid veroorzaken (dus het gevolg van de toediening), het virus kan milde verschijnselen geven zoals niezen, proesten, rochelen en een lichte benauwdheid

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

de inoculatie zorgvuldig maar binnen zo kort mogelijke tijd uitvoeren, verschijnselen van intratracheale toediening van IB zijn niet te voorkomen.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Er is een kleine kans dat kippen het humane eindpunt bereiken.

Wij achten het noodzakelijk om de kuikens te euthanaseren indien deze niet meer in staat zijn zelfstandig het voer en/of drinkwater tot zich te nemen of ernstig ziek zijn (bol zitten, apathie)

-
- Humane eindpunten kippen:
-
- 1. Uiterlijk:
- 0 = normaal;
- 1 = onverzorgde veren;
- 2 = oedeem en zwelling van de kop, het ooglid of de schenkel;
- 3 = abnormale houding;
-

- 2. Gedrag:
- 0 = normaal;
- 1 = kleine veranderingen;
- 2 = verminderde activiteit;
- 3 = immobiliteit;
-
- 3. Lichaamsgewicht:
- 0 = normaal;
- 1 = mager (~10% gewichtsverlies);
- 2 = zeer mager (~20% gewichtsverlies);
- 3 = broodmager (>20% gewichtsverlies);
-

Het humane eindpunt wordt bereikt als een of meer kritische parameters gelijk of hoger is dan 3.

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

< 1% (in eerder experimenten met IBV heeft inoculatie niet geleid tot het bereiken van een humaan eindpunt, de verschijnselen na inoculatie waren zoals verwacht: niezen, proesten en lichte benauwdheid

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 uitkomen van eieren: licht ongerief
labelen van de kuikens dmv wingtags: licht ongerief
doodmaken: licht ongerief
IBV inculatie: licht ongerief
Ziekteverschijnselen als gevolg van IBV inoculatie: matig ongerief

Cumulatief ongerief: licht (75% van de dieren), matig (25% van de 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.

Voor het onderzoek zijn cellen uit organen nodig. het is niet mogelijk deze organen te isoleren uit levende dieren

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

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3.4.4.2 Type dierproef: Bestuderen van de MDV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Een week oude SPF legkippen worden intra abdominaal geïnfecteerd met wild type MDV RB-1B, mutanten van MDV RB-1B, of MDV vaccin CVI988. Op 1, 4, 7 en 10 dagen na infectie/ vaccinatie worden de kippen doodgemaakt en worden relevante organen zoals thymus, milt en bloed verzameld. In het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek.

De keuze voor de tijdspunten waarop de kippen gedood worden is bepaald nav eerdere experimenten met deze MDV virussen waarin gekeken is naar de aanwezigheid van virus in het bloed. De virus titer in bloed neemt sterk toe tot 10 dagen na infectie (Greco *et al*, J. Virol 2014). De NK cel activiteit na infectie met deze virussen is niet eerder bepaald, maar gezien het feit dat NK cellen betrokken zijn bij de eerste afweer reactie wordt de NK activiteit verwacht in deze periode. Door op verschillende momenten de NK cel activiteit te bepalen kan ook de kinetiek van de response in kaart worden gebracht.
Primaire uitkomst parameters:

- Percentage van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen
- De activiteit van NK cellen (bepaling van de expressie van CD107, een eiwit wat op de buitenkant van geactiveerde NK cellen zit; productie van IFNγ.)

Secundaire uitkomstparameters: cytokines (IFNα/β/γ), virale load en percentages T cellen.

MDV is een celgebonden virus wat gekweekt wordt op chicken embryonic fibroblasts (CEF). Wanneer er gesproken wordt over een MDV vaccinatie of een MDV infectie zullen er dus geïnfecteerde CEF worden toegediend. Als negatieve controle zullen niet geïnfecteerde CEF ingespoten worden. Naast de virulente MDV stam RB1B zullen ook twee mutante virussen bestudeerd worden. Een van deze virussen mist het

belangrijke oncogen meq. Studies door de groep van professor [redacted] hebben aangetoond dat infectie met RB1B delta meq leidt tot een betere bescherming tegen hoog pathogene MDV virussen in vergelijking met commerciële vaccins. Het is de vraag of NK cellen een rol spelen in dit proces. Het andere virus mist zowel het oncogen meq als vIL8. IL-8 is een signaal stof die ervoor zorgt dat B en T cellen naar de plek van MDV infectie gaan (Engel *et al*, J. Virol 2012) waar ze geïnfecteerd kunnen worden met MDV. De lytische infectie die volgt leidt tot een afname van de hoeveelheid lymfocyten en is een van de mogelijke oorzaken van de immuunsuppressie door MDV. De verwachting is dat RB1B delta [redacted] delta [redacted] leidt tot een betere bescherming (het delta meq effect) en een verminderde immuun suppressie (het [redacted] effect). De rol van NK cellen in deze processen zal bestudeerd worden na infectie met dit virus.

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.

18 dagen bebroede SPF eieren worden gekocht van een Europese leverancier voor SPF eieren en verder uitgebroed in de broedmachines. Op dag 21 komen de kuikens uit het ei. De kuikens worden vervolgens in isolatoren gehuisvest en op dag 6 eenmaal geïnfecteerd/ gevaccineerd met MDV. MDV wordt intra abdominaal toegediend, ongeveer 2 minuten per kip. Op verschillende tijdstippen worden de kippen doodgemaakt door cervicale dislocatie of wanneer ze meer wegen dan 250 gram elektrische bedwelming gevolgd door verbloeding.

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

Het effect van MDV infectie op de NK activiteit is in de jaren 80 eerder beschreven (Sharma *et al*, Avian Diseases 1981). In deze studie werd gekeken naar verschil in NK activiteit tussen kippen die verschillen in MHC, waar met 5 kippen per groep verschillen in NK activiteit konden worden aangetoond tussen MHC ingeteelde kippen.
Het doel van de huidige studie is om de NK response na infectie met verschillende MDV virussen en een MDV vaccin te bestuderen in SPF leghennen. Daarnaast zijn de huidige NK assays zijn gevoeliger dan de assays uit de studie van Sharma *et al*, en wordt in onze studie in andere organen en op andere tijdstippen gemeten. Omdat in deze studie andere assays worden gebruikt om de NK activiteit te meten wat het lastig maakt om data uit deze studie te gebruiken voor een berekening van de van de groepsgrootte.

Uit de studie van Sharma *et al* kan worden geconcludeerd dat een groepsgrootte van 5 dieren genoeg is om een mogelijk verschil in NK activiteit aan te kunnen tonen. Op basis hiervan zal in deze studie een pilot worden uitgevoerd met 5 dieren per groep voor de verschillende MDV virussen en het vaccin.

Per virus is er een dag 0 (moment voor infectie), dag 1, 4, 7 en 10 5 tijdstippen x 5 dieren is 25 dieren

Dag 4, 7 en 10 zijn gekozen in overleg met een MDV onderzoeker uit Duitsland omdat uit studies in zijn groep gebleken is dat op die tijdstippen virus gedetecteerd kan worden. Dag 1 is gebaseerd op eerder onderzoek naar virus geïnduceerde NK activiteit. Zowel voor IBV als voor influenza is er een verhoogde NK activiteit gemeten op 1 dag na infectie. De hypothese is dat op dag 10 de NK activiteit weer op basaal niveau is, maw dat de virus geïnduceerde NK activiteit weer voorbij is. Dus de tijdstippen zijn zo gekozen dat ook de kinetiek van de MDV geïnduceerde NK activiteit bestudeerd kan worden.

Groep 1: negatieve controle (ongeïnfecteerde CEF)
Groep 2: RB1B (WT MDV)
Groep 3: RB1B delta [redacted] delta [redacted]
Groep 4: RB1B delta [redacted]
Groep 5: Rispens CVI988 (vaccin)

vijf behandelingsgroepen x 25 dieren is 125 kippen

B. De dieren

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

125 SPF legkuikens van 6 dagen oud. Er is gekozen voor legkippen omdat de lange termijn verbetering van de afweer response waar in dit project aan gewerkt wordt mn van belang is voor leghennen aangezien vleeskuikens maar kort leven. In het onderzoek naar MDV worden doorgaan SPF dieren gebruikt. Omdat we zoveel mogelijk aan willen sluiten bij eerder onderzoek waarin gekeken is naar virus titers en bescherming is er gekozen om de eerste studies naar het effect van MDV op de Nk cell response in SFP kuikens te doen.

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:
Voor het testen van de activiteit van het vroege afweer systeem is het noodzakelijk om cellen vers uit een dier te verkrijgen. Inzicht verkrijgen in immuun responsen kan deels middels computermodellen, echter voor de kip zijn computermodellen van immuun responsen nog niet beschikbaar. Het meten van de daadwerkelijk functionele activiteit dient nog steeds getest te worden met levende cellen.

De huidige MDV vaccins beschermen tegen ziekte maar niet tegen infectie. Dit betekent dat kippen in de pluimvee industrie wel geïnfecteerd worden met het virus, en de praktijk leert dat de MDV virussen sinds de invoering van MDV vaccinatie in 1970 steeds virulenter worden. Een mogelijke oorzaak voor het feit dat vaccinatie niet beschermt tegen infectie, is dat de huidige MDV vaccins het afweer systeem onderdrukken waardoor het virus niet volledig wordt opgeruimd (Nair *et al*, Vet. J. 2005)
Een ideaal MDV vaccin beschermt dus niet alleen tegen ziekte maar ook tegen infectie. Een hypothese is dat wanneer het lukt om een MDV vaccin te maken wat het afweersysteem niet onderdrukt, het virus wel wordt opgeruimd door een goed functionerend afweer systeem. De mutante virussen die in dit onderzoek gebruikt worden hebben mogelijk deze potentie.

CVI988: een van de huidige vaccins die onderdrukking van het afweer systeem veroorzaakt

RB-1B: een goed gekarakteriseerde MDV stam die al decennia lang gebruikt wordt in het MDV onderzoek

RB-1B mutanten: MDV virussen die mogelijk het immuun systeem niet onderdrukken: nieuwe kandidaat vaccins voor de toekomst.

CVI988 en de RB-1B mutante virussen zijn relevant voor de veterinaire praktijk, de RB-1B is indirect relevant omdat de vergelijking tussen wildtype en mutanten zal laten zien of er inderdaad een verschil is in afweerreactie en hoeveelheid virus na toediening van de mutante virussen in vergelijking tot de wildtype.

Testen in het lab hebben reeds aangetoond dat MDV embryonale NK cellen kan activeren. Deze in vitro assays zijn geen vervanging van de dierproef omdat in een dier verschillende populaties NK cellen voorkomen en het nog niet duidelijk is welke daarvan belangrijk zijn bij virale infecties. In de fysiologische situatie zullen ook cytokines gemaakt door geïnfecteerde epitheel cellen of andere cellen van het immuunsysteem een rol spelen. Dit kan niet worden nagebootst in een reageerbuis.

Vermindering:
Het aantal kippen wat gebruikt gaat worden in deze pilot studie is gebaseerd op eerdere studies waarin gekeken is naar NK cellen in MHC ingeteelde kippen.

Verfijning:
De dieren worden in een groep gehuisvest, onder een warmtelamp en hebben onbeperkt toegang tot voedsel en water.

De leghen is het doeldier binnen dit project, waardoor de uitkomsten makkelijk vertaalbaar zijn naar de uiteindelijke toepassing in de praktijk.

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.

1.De dieren worden in groepen gehouden in een omgeving die in ieder geval aansluit bij hun basisbehoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel, voer en watervoorziening.
2. Het welzijn en de gezondheid van de dieren wordt elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie..

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen. MDV kan leiden tot verlammingen verschijnselen en veroorzaakt tumoren. Dit gebeurt niet binnen de korte termijn na MDV infectie waarvan hier sprake is. Doorgaans beginnen deze verschijnselen ongeveer 4 weken na infectie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- Er is een kleine kans dat kippen het humane eindpunt bereiken.

Wij achten het noodzakelijk om de kuikens te euthanaseren indien deze niet meer in staat zijn zelfstandig het voer en/of drinkwater tot zich te nemen of ernstig ziek zijn (bol zitten, apathie)

-
- Humane eindpunten kippen:
-
- 1. Uiterlijk:
- 0 = normaal;
- 1 = onverzorgde veren;
- 2 = oedeem en zwelling van de kop, het ooglid of de schenkel;
- 3 = abnormale houding;
-
- 2. Gedrag:
- 0 = normaal;
- 1 = kleine veranderingen;
- 2 = verminderde activiteit;
- 3 = immobiliteit;
-
- 3. Lichaamsgewicht:
- 0 = normaal;
- 1 = mager (~10% gewichtsverlies);
- 2 = zeer mager (~20% gewichtsverlies);
- 3 = broodmager (>20% gewichtsverlies);
-

Het humane eindpunt wordt bereikt als een of meer kritische parameters gelijk of hoger is dan 3.

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

< 1%

K. Classificatie van ongerief

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

het uitkomen van eieren: licht ongerief
labelen van de kuikens dmv wingtags: licht ongerief
doodmaken: licht ongerief
MDV inoculatie: licht ongerief

Cumulatief ongerief: licht (100% van de 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.

Voor het onderzoek zijn cellen uit organen nodig. Het is niet mogelijk deze organen te isoleren uit levende dieren

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

DEC UTRECHT

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.811.020
2. Titel van het project : Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen
3. Titel van de NTS : Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen

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

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC	: DEC Utrecht
Telefoonnummer contactpersoon	: [redacted]
Emailadres contactpersoon	: dec-utrecht@umcutrecht.nl

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☒ ontvangen door DEC: 02-06-2017
   - ☐ aanvraag compleet: 14-06-2017
   - ☒ in vergadering besproken:
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 21-06-2017/17-07-2017 en 24-07-2017/28-07-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
   - ☐ aanpassing aanvraag:
   - ☒ advies aan CCD: 03-08-2017

7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

8. Eventueel horen van aanvrager
   - Datum:
   - Plaats:
   - Aantal aanwezige DEC-leden:
   - Aanwezige (namens) aanvrager:
   - Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
   - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager
   - Datum vragen: 21-06-2017
   - Datum antwoord: 17-07-2017
   - Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of de experimenten niet geheel of gedeeltelijk in vitro kunnen plaatsvinden om de keuze voor de virussen beter te onderbouwen en het aantal benodigde dieren te verminderen. Ook vraagt de DEC zich af wat voor in vitro onderzoek al is gedaan; de voorgeschiedenis mist.
  In de kip is nog relatief weinig bekend over NK cellen. Het is niet bekend hoe belangrijk de omgeving (bv signaalstoffen zoals cytokinen gemaakt door andere cellen) is voor de virus geïnduceerde activiteit van NK cellen of dat alleen de interactie van een virus en een NK cel voldoende is. Daarnaast is er in de kip geen marker die op alle NK cellen tot expressie komt. Er zijn wel verschillende NK cel subsets beschreven in verschillende organen van de kip, maar omdat de markers voor kippen NK cellen nog niet goed gekarakteriseerd zijn is het nog niet mogelijk om de vergelijking met zoogdieren te maken. Al deze factoren zorgen ervoor dat het op dit moment niet mogelijk is om in vivo NK studies te vervangen door in vitro experimenten. Het is totaal niet duidelijk hoe het in vitro werk zich verhoudt tot wat er in vivo gebeurt. Als een embryonale NK cel reageert in een in vitro assays, zegt dat niks over wat een long NK cel gaat doen na een respiratoire infectie. Het doel van deze aanvraag is juist om beter te gaan begrijpen hoe virussen NK cellen activeren, zodat het in de toekomst mogelijk is om in vivo proeven gedeeltelijk te vervangen door in vitro werk. Ook bevat deze aanvraag naast levende virussen studies met vaccins. Wanneer deze experimenten laten zien dat virussen en vaccins een vergelijkbaar effect hebben op de kippen NK cellen, kunnen in de toekomt vaccins gebruikt worden in eventuele in vivo proeven om zo het ongerief van de dieren te verminderen. Dit is nu uitgebreider beschreven in de aanvraag.
  In vitro onderzoek heeft plaats gevonden voor MDV virus zoals reeds beschreven in 3.1 "In vitro tests laten een verhoogde NK cel activiteit zien wanneer NK cellen 24 uur lang gekweekt zijn in aanwezigheid van MDV. In deze experimenten zijn NK cellen gekweekt in aanwezigheid van MDV vaccin en virussen die ook in de aanvraag beschreven staan". De vaccin stam induceerde een milde verhoging van de NK activiteit in vitro en de NK activiteit nam meer toe na incubatie met het virus RB-1B. In vitro onderzoek met IBV heeft ook plaatsgevonden, maar tot op heden is het niet gelukt om NK cellen geïsoleerd uit kippen te activeren door een co-kweek met IBV. Dit is in tegenstelling tot de in vivo experimenten die wel een verhoogde NK activiteit laten zien (Vervelde, DCI 2012)). Deze in vitro resultaten zijn nu toegevoegd aan de aanvraag.
- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert u een figuur toe te voegen waarin de andere (CCD goedgekeurde) projecten vermeld staan en de relatie met dit nieuwe project duidelijk wordt.
  Deze figuur is gemaakt en toegevoegd aan de aanvraag.
- 3.1 Achtergrond: De DEC raadt u aan persoonsnamen uit de aanvraag te verwijderen.
  Dit is aangepast.
- 3.2 Doel: De DEC ziet niet hoe u het hoofddoel wilt bereiken/beantwoorden met de voorgestelde proeven. Het is m.b.t. IBV geen mechanistisch onderzoek, maar beschrijvend

onderzoek. Het doel dient anders geformuleerd te worden. De DEC adviseert u aan om van de subdoelen het hoofddoel te maken.
Dit is aangepast.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U zegt: "*De kuikens worden vervolgens in isolatoren gehuisvest en op dag 21 eenmaal geïnfecteerd/ gevaccineerd met IBV. IBV inoculatie van zowel levend virus als vaccin gebeurt d.m.v. intratracheale (i.t.) en intra-nasale(i.t.) toediening, dit duurt ongeveer 5 minuten per kip*." Indien het om levend-verzwakte vaccins gaat betreft het een infectie en geen vaccinatie.
  Dit is nu aangepast, in de huidige versie staat er "De kuikens worden vervolgens in isolatoren gehuisvest en op dag 21 wordt virus of vaccin toegediend d.m.v. intratracheale (i.t.) en intranasale (i.t.) toediening, dit duurt ongeveer 5 minuten per kip".
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder of de wijze van toediening, intra-tracheaal en intra-nasaal, beiden gebeurt of dat een van de toedieningsvormen wordt gebruikt. Graag verhelderen.
  De toediening gebeurt zowel intra-tracheaal als intra-nasaal om ervoor te zorgen dat er voldoende virus of vaccin aanwezig is.
  Dit is aangepast.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: U heeft testen in het lab die NK-cellen kunnen activeren, maar is het effect van IBV en MDV al onderzocht en hoe zit het met de verschillen in beschikbare vaccins? Graag nader toelichten. Zie het eerste punt van 3.1 achtergrond.
  Dit is ook op deze plaats in de aanvraag nu uitgebreider toegelicht.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 24-07-2017
- Datum antwoord: 28-07-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:
  - Bijlage 2: De DEC heeft nog een vraag m.b.t. de proefopzet. Hierin wordt aangegeven dat: "*Een week oude SPF legkippen worden intra abdominaal geïnfecteerd met wild type MDV RB-1B, mutanten van MDV RB-1B, of gevaccineerd met het commerciële MDV vaccin CVI988.*" Wordt het MDV Rispens vaccin CVI988 subcutaan toegediend (volgens registratie uitsluitend subcutane toepassing) of wordt dit ook intra-abdominaal toegepast? Herpesvirussen vertonen soms een totaal ander infectiepatroon wanneer de wijze van inoculatie wordt veranderd (vgl ADV intranasaal, intramusculair en subcutaan). Zijn zaken vergelijkbaar als voor een verschillende wijze van inoculatie gekozen wordt? Er lijken "niet vergelijkbare groepen" te ontstaan. Graag verhelderen.
    In dit geval wordt CVI988 ook intra abdominaal toegediend, juist om de toedieningsroute vergelijkbaar te houden met de andere MDV virussen. Dit stond inderdaad niet duidelijk in de aanvraag en is nu veranderd in : "Een week oude SPF legkippen worden intra

abdominaal geïnfecteerd met wild type MDV RB-1B, mutanten van MDV RB-1B of CVI988." De intra-abdominale toediening van CVI988 is eerder uitgevoerd door collega's in Duitsland die zeer regelmatig MDV infectieproeven in kippen uitvoeren met verschillende MDV virussen. Een intra abdominale toediening van CVI988 levert geen problemen op. Vandaar dat in overleg met hen gekozen is voor deze aanpak.

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC is nog niet tevreden met uw toelichting op de vraag over de testen in het lab. De keuze voor de verschillende vaccins/virusstammen is nog onvoldoende toegelicht, waardoor de ratio van de verschillende groepen niet navolgbaar is. Zijn bijvoorbeeld alle vaccins/virusstammen relevant zijn voor de veterinaire praktijk? Graag nog nader toelichten.

  <u>Bijlage 1 IBV:</u>

  Voor IBV zijn alle vaccin en virusstammen relevant voor de praktijk. IBV is een respiratoir virus in pluimvee. Het virus infecteert de epitheliale cellen van de bovenste luchtwegen en afhankelijk van het tropisme ook epitheel cellen van nieren en oviduct.

  In het verleden is door ons in vivo onderzoek gedaan naar de NK response na infectie met de IBV veldstam M41. Dit resulteerde in de bevinding dat de NK cel response in de longen verhoogd is na IBV infectie.

  In een eerdere CCD aanvraag kwam de vraag van de DEC of het niet mogelijk was om IBV vaccin stammen te gebruiken i.p.v. de IBV veldstam, omdat dit minder ongerief bij de dieren oplevert. Mijn antwoord toen was dat de NK response na toediening van IBV vaccin stammen zoals H52 en H120 nog nooit gemeten is, en dat het niet mogelijk is om dit te voorspellen omdat het mechanisme achter de IBV geïnduceerde NK activiteit niet duidelijk is.

  In deze aanvraag komt de onderzoeksvraag of IBV vaccins in staat zijn om eenzelfde activiteit in long NK cellen te induceren als de veldstam M41. Het is niet mogelijk om deze vraag uitsluitend met testen in het lab te beantwoorden, omdat het technisch niet mogelijk is om epitheliale cellen van de luchtwegen uit een kip te isoleren, te kweken en te infecteren met IBV. Ook is het niet duidelijk welke populatie NK cellen uit de kip gehaald zouden moeten om de IBV geïnduceerde activiteit van long NK cellen te kunnen meten.

  Er zijn experimenten gedaan waarin geprobeerd is om long NK cellen te activeren door deze te kweken in de aanwezigheid van virus maar dit is nooit gelukt. Dit is dus in tegenstelling met de verhoogde NK activiteit in kippen een dag na IBV infectie.

  Omdat het niet mogelijk is om deze vraag in het lab te beantwoorden (wat ook de voorkeur zou hebben van de onderzoeker omdat dat minder dieren maar ook minder tijd en geld kost) is deze aanvraag geschreven om het effect van IBV en IBV vaccins op de activiteit van long NK cellen te onderzoeken.

  <u>Bijlage 2 MDV:</u>

  De huidige MDV vaccins beschermen tegen ziekte maar niet tegen infectie. Dit betekent dat kippen in de pluimvee industrie wel geïnfecteerd worden met het virus, en de praktijk leert dat de MDV virussen sinds de invoering van MDV vaccinatie in 1970 steeds virulenter worden. Een mogelijke oorzaak voor het feit dat vaccinatie niet beschermt tegen infectie, is

dat de huidige MDV vaccins het afweer systeem onderdrukken waardoor het virus niet volledig wordt opgeruimd (Nair V. Evolution of Marek's disease – a paradigm for incessant race between the pathogen and the host. Vet. J. 2005;170:175–183).
Een ideaal MDV vaccin beschermt dus niet alleen tegen ziekte maar ook tegen infectie. Een hypothese is dat wanneer het lukt om een MDV vaccin te maken wat het afweersysteem niet onderdrukt, het virus wel wordt opgeruimd door een goed functionerend afweer systeem. De mutante virussen die in dit onderzoek gebruikt worden hebben mogelijk deze potentie.
CVI988: een van de huidige vaccins die onderdrukking van het afweer systeem veroorzaakt
RB-1B: een goed gekarakteriseerde MDV stam die al decennia lang gebruikt wordt in het MDV onderzoek
RB-1B mutanten: MDV virussen die mogelijk het immuun systeem niet onderdrukken: nieuwe kandidaat vaccins voor de toekomst.
CVI988 en de RB-1B mutante virussen zijn relevant voor de veterinaire praktijk, de RB-1B is indirect relevant omdat de vergelijking tussen wildtype en mutanten zal laten zien of er inderdaad een verschil is in afweerreactie en hoeveelheid virus na toediening van de mutante virussen in vergelijking tot de wildtype.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Pluimvee wordt tegen virusinfecties beschermd middels vaccinaties en door medicijnen in het voer. Medicatie in het voer kan echter leiden tot antibioticaresistentie en wordt om die reden meer en meer aan banden gelegd. De focus komt derhalve steeds meer te liggen op vaccinaties die de afweer verbeteren. Om hiertoe effectieve vaccins te ontwerpen is het van essentieel belang om te begrijpen hoe het afweersysteem pathogenen bestrijdt. Het afweersysteem bestaat uit twee delen, het innate (oftewel het aangeboren) en het adaptieve afweersysteem. Een belangrijke component van het

innate afweersysteem zijn de zogenaamde "natural killer" (NK) cellen welke worden geacht een belangrijke bijdrage te leveren aan de afweer tegen virus infecties. Daarnaast zijn NK cellen belangrijk in het initiëren van de adaptieve afweer respons die vervolgens op gang komt.
De ontwikkeling van NK cellen bij kippen is echter nog onvoldoende onderzocht. Het is bekend dat bepaalde virussen in staat zijn om NK cellen in de kip te activeren, maar hoe en waar de virussen de kippen NK cellen aanzetten is nog niet duidelijk. Tevens is niet bekend of NK cellen uitsluitend geactiveerd worden door levende virussen, of dat ook (geïnactiveerde) vaccin stammen leiden tot een verhoogde NK cel activiteit en of verschillende virussen elk hun eigen 'strategie' hebben om NK cellen aan te zetten, of dat er een uniform mechanisme is waardoor de NK cel wordt aangezet tijdens een virale infectie. Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager de NK activiteit bestuderen na infectie met verschillende pluimvee virussen en na vaccinatie met verschillende pluimvee vaccins. De focus zal liggen op twee economisch relevante pluimvee virussen, namelijk het respiratoire virus IBV en het Marek's Disease Virus (MDV), een kippen herpesvirus. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen komt overeen met voorbeeld 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.

3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is 1) vaststellen of er een verschil is in NK activiteit na toediening van IBV virus of IBV vaccins en 2) het meten van de NK activiteit in de kip na infectie met verschillende MDV virussen. Het uiteindelijke doel van het project is het ontwikkelen van strategieën om de NK cel te sturen en zodoende kuikens beter te beschermen tegen infectieziekten. De DEC is van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het veld van onderzoek, het doeldier namelijk kuikens/kippen en mogelijk de industrie die de NK cel stimulerende middelen produceert. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en mogelijk pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De proefdieren zijn tevens doeldieren en voor hen geldt dat dit project een bijdrage zal leveren aan het ontwikkelen van een doeltreffende therapie ter bescherming tegen infectieziekten, wat het welzijn en de rechtvaardigheid bevorderd. Voor het onderzoeksveld geldt dat dit project kan bijdragen aan een goede wetenschappelijke reputatie en kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten. Belanghebbenden zijn indirect ook de samenleving en humane patiënten omdat kennis over de NK response in de kip na infectie met de pluimvee virussen MDV en IBV ook kan leiden tot een

beter begrip van de antivirale immuun response in mensen. Daarnaast zou de ontwikkeling van nieuwe vaccins het gebruik van antibiotica (virus infecties plaveien de weg voor bacteriële infecties) in de pluimvee industrie kunnen terugbrengen en daarmee het ontstaan van resistentie.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep doet sinds 2007 onderzoek naar kippen NK cellen en er wordt nauw samengewerkt met een onderzoeksgroep uit München die al meer dan 30 jaar onderzoek doet naar kippen NK cellen en naar NK cel receptoren. Het onderzoek naar MDV wordt uitgevoerd in nauwe samenwerking met onderzoeksgroepen in Duitsland en de UK die veel expertise hebben op het gebied van MDV. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De opzet van beide bijlagen is in de basis gelijk. In bijlage 1 wordt de NK cel respons na infectie of vaccinatie met IBV en in bijlage 2 na infectie of vaccinatie met MDV bestudeerd. In bijlage 1 worden hiertoe drie weken oude leghennen geïnfecteerd met een levend IBV virus of gevaccineerd met twee IBV vaccins en in bijlage 2 met een MDV vaccin, of verschillende MDV virussen. Op verschillende tijdspunten na infectie/vaccinatie worden de kippen doodgemaakt en worden relevante organen zoals thymus, milt en bloed verzameld. In het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek. Er zit geen go/no go tussen het gebruik van virus en vaccin of beide bijlagen; omdat het om verschillende virussen en vaccins gaat zullen ze allemaal onderzocht worden. De primaire uitkomst parameters in de bijlagen zijn hetzelfde: de frequentie van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen en de NK cel activiteit. DEC is overtuigd dat de strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
   - ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
   - ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
   - ☐ Dieren in/uit het wild (10f)

☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
☐ Zwerfdieren (10h)
☐ Hergebruik (1e lid 2)
☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. In bijlage 1 is het cumulatieve ongerief voor 75% van de dieren ingeschat als licht, ten gevolge van het uitkomen van de eieren, het labelen van de kuikens d.m.v. wingtags, de IBV inoculatie en het doden van de dieren. De ziekteverschijnselen als gevolg van de IBV inoculatie kunnen matig ongerief veroorzaken. De verwachting is dat dit bij 25% van de dieren zal gebeuren. In bijlage 2 is het cumulatieve ongerief voor alle dieren ingeschat als licht. Dit wordt veroorzaakt door het uitkomen van de eieren, het labelen van de kuikens d.m.v. wingtags en de MDV inoculatie en het doden van dieren. De DEC is van mening dat het hierboven beschreven cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

12. De integriteit van de dieren uit beide bijlagen wordt fysiek aangetast door het aanbrengen van zg. wingtags, hetgeen een lichte ingreep is en kan de intratracheale inoculatie van het IBV virus (bijlage 1) leiden tot niezen, proesten en lichte benauwdheid.

13. De humane eindpunten zijn voor de twee bijlagen goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is in beide bijlagen minder dan 1 % hetgeen naar de mening van de DEC realistisch is. De welzijnsscore wordt uitgevoerd met een beproefd systeem voor kuikens/kippen. Op basis van de ervaring dat in eerdere experimenten inoculatie met het IBV virus niet heeft geleid tot het bereiken van het human eindpunt acht de DEC de inschatting van minder dan 1% ook voor de dieren die geïnoculeerd worden met het MDV virus realistisch.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voor het testen van de activiteit van het vroege afweer systeem zijn cellen uit een vers gedood dier nodig. Computermodellen van de immuun response van de kip zijn (nog) niet beschikbaar. In bijlage 1 is de onderzoeksvraag of IBV vaccins in staat zijn om eenzelfde activiteit in long NK cellen te induceren als de veldstam M41. Het is niet mogelijk om deze vraag uitsluitend met *in vitro* testen te beantwoorden, omdat het technisch niet mogelijk is om epitheliale cellen van de luchtwegen uit een kip te isoleren, te kweken en te infecteren met IBV. Wat betreft bijlage 2 is *in vitro* reeds aangetoond dat MDV embryonale NK cellen kan activeren. Deze *in vitro* assays zijn echter geen vervanging van de dierproef omdat in een dier

verschillende populaties NK cellen voorkomen en het nog niet duidelijk is welke daarvan belangrijk zijn bij virale infecties. In de fysiologische situatie zullen ook cytokines, gemaakt door geïnfecteerde epitheelcellen of andere cellen, van het immuunsysteem een rol spelen. Dit kan niet *in vitro* worden nagebootst. Om de doelstelling van dit project te kunnen behalen zijn dus *in vivo* experimenten noodzakelijk.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Bij de schatting van het aantal benodigde dieren is uitgegaan van een groepsgrootte van maximaal 5 kippen, omdat uit eerder vergelijkbaar onderzoek is gebleken dat een dergelijke groepsgrootte voldoende groot is om statistisch en biologisch significante verschillen tussen groepen aan te tonen.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er wordt gebruik gemaakt van leghennen omdat het doel van het project met name van belang is voor leghennen, die langer leven dan vleeskuikens, en de onderzoeker hiermee zo dicht mogelijk bij de praktijksituatie blijft.
    Er worden naast levende virussen ook experimenten met vaccins uitgevoerd. Wanneer deze experimenten laten zien dat virussen en vaccins een vergelijkbaar effect hebben op de kippen NK cellen, kunnen in de toekomt vaccins gebruikt worden in eventuele *in vivo* proeven om zo het ongerief van de dieren te verminderen.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. In beide bijlagen wordt gewerkt met leghenkuikens omdat dit de doeldieren zijn. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen leghenkuikens uit te voeren.

19. De dieren in beide bijlagen worden in het kader van het project gedood omdat uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd worden voor verder onderzoek. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.

20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk vaststellen of er een verschil is in NK activiteit na toediening van IBV virus of IBV vaccins en het meten van de NK activiteit in de kip na infectie met verschillende MDV virussen, met als ultieme doel de afweer tegen infectieziekten in kippen te versterken, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een beperkte tot aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats met, voor 75% van de dieren, licht en, voor 25% van de dieren, matig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat meer inzicht verkregen wordt in hoe virussen NK cellen activeren en kunnen onderzoekers strategieën gaan ontwikkelen om de NK cel te sturen en op deze manier kuikens/kippen beter beschermen tegen infectieziekten. Dit zal er toe bijdragen dat het dierenwelzijn van kippen verbeterd. De DEC kent hier veel gewicht aan toe. Als resultante van het slagen van dit project moet ook worden genoemd dat het antibiotica gebruik in de pluimveehouderij dan teruggebracht zou kunnen worden, hetgeen voor de gemeenschap en voor humane patiënten een groot voordeel biedt, omdat antibiotica resistentie dan mogelijk beter onder controle te brengen is. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat de belangen voor het onderzoeksgebied, voor het welzijn van kuikens/kippen in de pluimveehouderij en voor de gemeenschap opwegen tegen de beperkte tot aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

   ☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

   ☐ De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

   ☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Centrale Commissie Dierproeven

7.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1080020172905

Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 augustus 2017. Het gaat om uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020172905. 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.

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:
- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	10800
Naam instelling of organisatie:	Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	30275924
Postbus:	12007
Postcode en plaats:	3501 AA UTRECHT
IBAN:	NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 oktober 2017
Geplande einddatum:	1 oktober 2020
Titel project:	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen
Titel niet-technische samenvatting:	Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen
Naam DEC:	DEC Utrecht
Postadres DEC:	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC:	dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Utrecht
Datum:	7 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1080020172905

Bijlagen
2

Datum 8 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 8 augustus 2017
Vervaldatum: 7 september 2017
Factuurnummer: 172905
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020172905	€ 1.287,00

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

8.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1080020172905

Datum 15 augustus 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Op 8 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" met aanvraagnummer AVD1080020172905. 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
Kunt u een nieuwe NTS sturen waarin 3.1 en 3.2 minder technisch en met voor een leek begrijpelijk taalgebruik zijn beschreven?

Onder 4.3 schrijft u 'Kippen worden gedood indien ziekteverschijnselen worden geconstateerd die duiden op ernstig ongerief.' Uit de aanvraag blijkt echter niet dat er sprake is van ernstig ongerief. Kunt u dit anders verwoorden zodat het in overeenstemming is met de aanvraag?

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:
15 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:
- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting

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 Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Adres:	.....
Postcode en plaats:	.....
Aanvraagnummer:	AVD1080020172905

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:
15 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

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

9.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn
Utrecht
[redacted]
Postbus 12007
3501 AA UTRECHT

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1080020172905
Bijlagen
1

Datum 12 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 8 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" met aanvraagnummer AVD1080020172905. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 31 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe 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.

U kunt met uw project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 1 oktober 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
[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:	Universiteit Utrecht/ Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Adres:	Postbus 12007
Postcode en plaats:	3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer:	10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 1 oktober 2020, voor het project "Bestudering van de natural killer response na virus infecties in kippen" met aanvraagnummer AVD1080020172905, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [redacted]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 3 augustus 2017, ontvangen op 8 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 31 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Bestuderen van de IBV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie				
	Kippen / leghennen	80	25% Matig 75% Licht	
3.4.4.2 Bestuderen van de MDV specifieke NK cel response in kippen na infectie of vaccinatie				
	Kippen /	125	Licht	

Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD1080020172905

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.