3084

Centrale Commissie Dierproeven

1.

23 AUG. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 11200

☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	
Straat en huisnummer	
Postbus	
Postcode en plaats	
IBAN	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	

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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

(Titel) Naam en voorletters	
Functie	
Afdeling	
Telefoonnummer	
E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01-01-2018
		Einddatum	31-12-2022
3.2	Wat is de titel van het project?	De structuur en functie van corticale netwerken	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	[redacted]
		Postadres	
		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
Inkoopordernummer: WBS-element R/000139.01

Factuuradres: Invoice@vu.nl

Vrije Universiteit Amsterdam
F&A/FSC/BA HG 1E-20
Ref: 2900/Beta
De Boelelaan 1105
1081 HV Amsterdam

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de 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	21-08-2017
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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam
1.3	Vul de titel van het project in.	De structuur en functie van corticale netwerken

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.

Onze neocortex is onderdeel van de grote hersenen en direct betrokken bij een grote verscheidenheid aan hersenfuncties zoals het verwerken van zintuiginformatie, het koppelen van zintuiginformatie aan beweging en het uitvoeren van hoger cognitief gedrag. Het bouwplan van de verschillende corticale gebieden lijkt in grote lijnen op elkaar, ondanks grote verschillen in uitvoerende taken. In alle gebieden zijn bijvoorbeeld corticale lagen van elkaar te onderscheiden, en zijn de celtypes die worden aangetroffen in grote lijnen vergelijkbaar. [redacted] Het snorhaarsysteem van de rat is een zeer goed en veelgebruikt model voor de somatosensorische cortex van mensen, waar informatie van bijvoorbeeld onze vingertoppen verwerkt wordt (de gevoeligheid van rat en mens voor zintuigstimulatie is gelijk en ook de anatomische opbouw toont veel overeenkomsten).

[redacted]

Het basisplan betreft corticale lagen waarin informatie aankomt (met name Laag 4) en lagen van waaruit informatie verzonden wordt naar volgende hersengebieden (met name Laag 5 en 6). Uiteindelijk zorgt de verzameling corticale celtypes voor het adequaat verwerken van informatie en het aansturen van relevant gedrag. Het is dan ook logisch dat veel hersenziektes hun oorsprong vinden in verstoorde functie van de neocortex. Enkele voorbeelden zijn ADHD, autisme, maar ook minder voor de hand liggende ziektes als Multiple Sclerosis, ziekte van Alzheimer of ziekte van Parkinson zijn te herleiden naar corticale dysfunctie. Een groot probleem voor de medische wereld is echter, dat het niet bekend is wat de functie is van individuele celtypes in gezonde hersenen en een stevig fundament ontbreekt dus voor een gedegen fundamenteel inzicht in de ziekte ten tijde van vermindering of verlies van hersenfuncties.

Er is inmiddels relatief veel bekend over de **structuur** van individuele celtypes in met name sensorische cortex en er wordt veel onderzoek gedaan naar corticale activiteit tijdens gedrag. Maar er is nog maar heel weinig kennis beschikbaar over de directe koppeling tussen de **functie** van corticale lagen en geïdentificeerde celtypes tijdens normaal gedrag. **Het *hoofddoel* van deze aanvraag is de fundamentele principes te ontrafelen waarop de corticale kolom en de individuele bouwstenen zich gedragen tijdens een 1) eenvoudige en 2) complexe gedragstaak.** Het hoofddoel is op te splitsen in meerdere subdoelen, die niet los van elkaar uitgevoerd kunnen worden.

Teneinde algemene principes te ontrafelen over het corticale circuit is het van groot belang de organisatorische principes van verschillende corticale gebieden in kaart te brengen, waaronder gebieden die bij hoger cognitief gedrag betrokken zijn. Dit betreft bijvoorbeeld de associatie cortex waar een brug tussen sensorische cortex (inkomende zintuiginformatie) en motor cortex (uitgaande motorische aansturing) wordt gelegd. Tenslotte wordt de sensorische en associatie cortex vergeleken met prefrontale cortex waar integratie plaatsvindt van een nog groter aantal verschillende informatiestromen. Het combineren van meerdere informatiestromen in de prefrontale cortex leidt uiteindelijk tot strategisch gedrag, dat in grote mate bijdraagt aan onze sociaal interactie en intelligentie. Aangezien de rekenkracht van de drie corticale gebieden verschillen, is het hoofddoel van deze aanvraag de kennis over de organisatorische principes (structuur en functie) van verschillende hersengebieden op cellulair niveau in kaart te brengen en te vergelijken. Daarnaast is het van groot belang om de complete structuur van individuele celtypes in kaart te brengen om inzicht te krijgen in de stroom van informatie door het corticale netwerk. In het verleden is de structuur van een groot aantal celtypes uit visuele en somatosensorische cortex in kaart gebracht (oa. Allen Brain Instituut), maar altijd op basis van dunne hersenplakjes (350 μm) waarin slechts ~15% van de oorspronkelijke axonale architectuur aanwezig is en

de rest afgesneden. In het huidige voorstel zal met een in vivo benadering 100% van de structuur in kaart gebracht worden in zowel associatie als prefrontale cortex.

-Subdoel: het in kaart brengen van de functie van individuele corticale lagen en celtypes in *uiteenlopende* corticale gebieden tijdens eenvoudig en complex gedrag.

Het onderzoek uit deze aanvraag borduurt voort op eerdere studies [redacted] met bijbehorende publicaties in gerenommeerde internationale tijdschriften als eerste en laatste auteur. Daarnaast is het onderzoek van deze aanvraag wetenschappelijk getoetst middels verschillende toegekende projectaanvragen.

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 **hoofddoel** van dit project is fundamenteel inzicht te krijgen in de functie van individuele lagen en celtypes in verschillende gebieden ([redacted]) tijdens gestandaardiseerd gedrag. Dit gedrag betreft òf het verwerken van zintuiginformatie (eenvoudige taak) òf het maken van een afgewogen beslissing op basis van zintuiginformatie (complexe taak). De combinatie van gestandaardiseerd gedrag met state-of-the-art elektrofysiologische metingen in 3 verschillende hersengebieden zal leiden tot gedetailleerd inzicht in de organisatorische principes van de corticale kolom in deze hersengebieden en inzicht geven in de functies van corticale lagen en celtypes [redacted]

Subdoel 1: **gedetailleerde morfologische typering van celtypes.**
Ondanks het bestaan van grote databases met gepubliceerde morfologiën is onze huidige kennis over celtypes nog altijd zeer beperkt, omdat de kennis vooral opgedaan is aan dunne hersenplakjes waarbij een groot deel van de oorspronkelijke structuur afgesneden wordt. Een ander fundamenteel probleem bij deze experimenten is het gebruik van jonge dieren (14-18 dagen oud) waardoor de beschreven structuur van hersencellen niet overeenkomt met de structuur zoals deze in volwassen hersenen wordt aangetroffen. Ten slotte zijn celtypes voornamelijk beschreven in visuele en somatosensorische cortex. Er is zodoende een hiaat in onze kennis over de complete structuur van specifieke celtypes in associatie en prefrontale cortex in volwassen hersenen.

Onze werkhypothese is dat de bouwstenen van corticale kolommen in verschillende hersengebieden in grote lijnen overeenkomen, maar dat de gedetailleerde structuur en functie van celtypes is afgestemd op het specifieke hersengebied. [redacted]

Subdoel 2: bestudering van activiteit (=functie) van corticale lagen en celtypes tijdens eenvoudig gedrag.
Het eenvoudige gedrag bestaat uit spontaan gebruik van de snorharen (whiskers) en betreft beweging en als resultaat, aanraking van een object. Dit gedrag is aangeboren en dus niet aangeleerd. Het gedrag wordt ook niet beloond, waardoor er geen associatie ontstaat met positieve/negatieve consequenties van dit gedrag. Het is van groot belang om corticale activiteit in [redacted] in kaart te brengen tijdens dit naïef gedrag, omdat deze metingen de functie van corticale lagen ontrafelen tijdens eenvoudig, aangeboren gedrag.

[redacted]

[redacted]. Met de huidige aanvraag wordt toestemming gevraagd om de activiteit te onderzoeken van alle corticale lagen in drie relevante gebieden tijdens eenvoudig gedrag.

[redacted]

Subdoel 3: bestudering van activiteit (=functie) van corticale lagen en celtypes tijdens complex gedrag.
Het complexe gedrag bestaat uit een aangeleerde gedragstaak waarbij zintuiginformatie leidend is voor de rat om het aangeleerde en gewenste gedrag te vertonen (Figuur 3). De complexe gedragstaak is uitdagender voor de rat om uit te voeren en de werkhypothese is dan ook dat de verschillende relevante hersengebieden andere activiteit vertonen in vergelijking met de eenvoudige gedragstaak (subdoel 1).

[redacted]

Subdoel 4: causaliteit tussen corticale activiteit en gedrag.
Subdoelen 1 en 2 zullen een gedetailleerd beeld geven over de *correlatie* tussen neuronale activiteit in corticale lagen en celtypes en gedrag. Echter, om een *causaal* verband te kunnen leggen tussen gedrag en activiteit van corticale lagen of celtypes wordt in dit vierde subdoel neuronale activiteit in S1, PPC of PFC gemanipuleerd via optogenetische modulatie van individuele celtypes (activatie en/of remming van activiteit) om het causale verband met gedrag te kunnen kwantificeren.

Haalbaarheid:
[redacted]. Het team bestaat uit een toereikend aantal personen met de vereiste expertise om de huidige aanvraag succesvol uit te voeren. Er wordt gebruikt gemaakt van state-of-the-art technieken en door middel van reeds toegekende geldaanvragen is de financiering voor het onderzoek gewaarborgd. De wetenschappelijke toetsing tijdens de geld-aanvragen geeft verder aan, dat dit onderzoek van zeer hoge kwaliteit is en dat er een bewezen wetenschappelijke noodzaak is voor de uitvoering hiervan.

[redacted]

[redacted]

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

Het wetenschappelijke doel op de korte termijn is het vergroten van de fundamentele kennis over de structuur en functie van verschillende corticale lagen tijdens eenvoudig en complex gedrag. Op de lange termijn zullen de onderzoeksresultaten kunnen bijdragen aan brein-machine interfaces (zoals het uitlezen van hersenactiviteit voor het aansturen van een elektronisch apparaat/neuroprosthese).

Maatschappelijk belang

Corticale circuits zijn betrokken bij een uiteenlopend spectrum van cognitieve taken, zoals het verwerken van zintuiginformatie, het nemen van beslissingen of concentratievermogen. Verstoringen van de normale functie kan leiden tot veelvoorkomende ziektes als ADHD, PTSD en depressie. De behandeling bestaat doorgaans uit medicatie die verre van specifiek is voor individuele bouwstenen van het corticale circuit en medicatie is waarschijnlijk hierdoor niet altijd effectief, of kan leiden tot symptoomverergering en/of bijwerkingen. Ons standpunt is dat het cruciaal is om een gedetailleerd beeld te krijgen van de functie van corticale lagen en celtypes in het gezonde brein om vervolgens te kunnen bepalen waar verstoringen in het circuit optreden, die leiden tot hersenziektes. De kennis die uit deze aanvraag zal voortkomen zal een belangrijke stap voorwaarts zijn in onze kennis over de functie van individuele lagen en celtypes in 3 uiteenlopende corticale gebieden tijdens goed omschreven normaal gedrag. Met de fundamentele inzichten die hieruit voortkomen, zal op termijn wellicht de behandeling van veelvoorkomende hersenziektes te verfijnen zijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De huidige vergunningsaanvraag is onderdeel van een langlopende onderzoekslijn waarbij de structuur en functie van individuele corticale neuronen wordt onderzocht. [redacted].

Het onderzoek is opgebouwd uit 4 onderdelen:
1) *morfologische reconstructie van neuronen in drie corticale gebieden, die betrokken zijn bij eenvoudig en complex gedrag.*
Met anatomisch onderzoek zullen we de dendritische en axonale architectuur digitaliseren en analyseren. Hiervoor gebruiken we *in vivo* kleuringen van individuele neuronen in verdoofde ratten en *ex vivo* histologie. De lengte en vertakkingsschema van individuele structuren zal in detail gekwantificeerd worden. De morfologiën worden geschaald naar anatomische kenmerken (pia en witte stof) zodat bekend is welke morfologiën in specifieke corticale lagen gevonden worden. De locatie van de elektrofysiologische metingen (subdoel 2-4) wordt bepaald aan de hand van histologische markeringen (multi-unit elektrofysiologie) of aan de hand van dendritische reconstructie (single-unit elektrofysiologie). De resultaten uit subdoel 1 (structuur) en subdoelen 2-4 (functie van celtypes en corticale lagen) zal op deze manier gecombineerd kunnen worden en leiden tot nieuwe inzichten over de structuur en functie van individuele celtypes en specifieke corticale lagen.

2) *Onderzoeken welke corticale lagen in de drie relevante gebieden actief zijn tijdens eenvoudig gedrag.* Hiertoe wordt gebruik gemaakt van elektrofysiologische metingen in ratten, die aangeboren gedrag vertonen (spontaan, niet aangeleerd gedrag). De ratten zullen een operatie ondergaan waarbij een kleine opening in de schedel wordt gemaakt voor elektrofysiologische metingen. Na een herstelperiode van enkele dagen en gewenning aan kop-fixatie vertonen de ratten volledig natuurlijk gedrag. Tijdens dit natuurlijke, eenvoudige gedrag wordt de activiteit van verschillende corticale lagen in drie relevante hersengebieden bepaald.

3) *Onderzoeken welke corticale lagen in de drie relevante gebieden actief zijn tijdens een complexe, (aangeleerde) gedragstaak.* De ratten zullen een operatie ondergaan om elektrofysiologische metingen mogelijk te maken. Na een herstelperiode van enkele dagen zullen de ratten gedurende enkele weken de gedragstaak aangeleerd worden. Dit bestaat uit een object, dat in een Go positie staat (relatief dichtbij) of in de No-Go (relatief veraf). De rat is afhankelijk van zijn snorharen om de positie te bepalen. In de Go positie kan de rat likken voor een waterbeloning. De rat mag niet likken wanneer het object in de No-Go positie staat. De activiteit in verschillende corticale lagen en hersengebieden zal bepaald worden ten opzichte van detectie-, keuze- en beloningsmomenten gedurende deze gedragstaak.

4) *Vaststellen wat en hoe de verschillende corticale lagen in de drie relevante hersengebieden bijdragen aan eenvoudig en complex gedrag.*
Uitkomsten van doel 2 en doel 3 zullen gebruik worden om gericht interventies uit te voeren op de activiteit van corticale lagen in verschillende hersengebieden om het causale verband tussen activiteit en gedrag te bepalen. [redacted]. Voor de interventie gebruiken we virussen die een eiwit tot expressie brengen in neuronen waarmee we deze neuronen kunnen stimuleren met licht (optogenetica, Yizhar *et al.*, 2011) We kunnen beginnen met de interventies tijdens eenvoudig gedrag voordat alle studies naar doel 3 zijn afgerond.
Ratten ondergaan een operatie waarbij virus wordt geïnjecteerd en de opening in de schedel maakt het mogelijk om elektrofysiologische metingen uit te voeren. Na een herstelperiode van enkele dagen (eenvoudig gedrag) tot enkele weken (complex gedrag) zullen de ratten de taak uitvoeren en zullen de corticale lagen op specifieke momenten (met milliseconde precisie) worden uitgeschakeld en het effect op elektrische activiteit bepaalt worden. De combinatie van het opnemen van de neuronale activiteit en het moduleren van die activiteit tijdens gedrag zijn krachtige gereedschappen om de functie van corticale lagen aan te tonen.

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

<u>1. Morfologie</u>
Voor dit subdoel ondergaan de ratten een operatie waarbij onder diepe anesthesie een gat in de schedel geboord zal worden en een kleurstof geïnjecteerd zal worden in individuele neuronen. Na een paar uur zal de kleurstof door de cel verspreid zijn en zal het dier worden gedood en na *ex vivo* histologie worden de hersenen onderzocht voor anatomische doeleinden. De dendritische en axonale structuren van individuele celtypes worden vervolgens met sub(micrometer) resolutie gereconstrueerd. De positie van de gereconstrueerde cel wordt aan de hand van anatomische ijkpunten bepaald om uiteindelijk een realistisch computermodel te bouwen van het corticale microcircuit. De ontwikkeling en validatie van het realistische computermodel wordt in een internationale samenwerking gedaan.

<u>2. Eenvoudig gedrag</u>
Voor deze proefopzet ondergaan de ratten een korte habituatie-training (enkele dagen) om gewend te raken aan de onderzoeker. Vervolgens wordt een opening gemaakt over het te meten corticale gebied en een head-post op de schedel geplaatst (dag 0). Vervolgens wordt de rat getraind om te wennen aan het vastzetten van de kop. Gelijktijdig raakt de rat gewend aan de meetopstelling en zal de rat normaal gedrag vertonen tijdens head-fixatie. Wanneer de rat goed getraind is wordt de elektrofysiologische meting uitgevoerd en gelijktijdig het spontane gedrag opgenomen zodat de elektrofysiologische meting nauwkeurig aan gedrag gekoppeld kan worden. Aan het eind van de meting wordt door middel van ex vivo histologie de meetlocatie te bepaald. Het doel van deze (eenmalige) metingen is om de activiteit van corticale lagen en verschillende gebieden in kaart te brengen als de rat spontaan, aangeboren gedrag vertoond (niet aangeleerd).

3. Complex gedrag

Deze proefopzet betreft een aangeleerde gedragstaak en geeft zodoende inzicht in andere type hersenfunctie ten opzichte van subdoel 2.

Subdoel 3 betreft een trainingsfase waarin de ratten aangeleerd wordt de snorharen te gebruiken voor het bepalen van de positie van een object en gewenst gedrag te vertonen aan de hand van de positie van het object. Dit wordt aangeduid als de Go/No-Go taak. In vergelijking met de eenvoudige gedragstaak is de Go/No-Go een veel uitdagendere proefopzet. [redacted].

De ratten ondergaan op dag 0 een operatie voor het bevestigen van een head-post voor kopfixatie en het maken van een craniotomie om elektrofysiologische metingen mogelijk te maken. Vervolgens ondergaan de ratten verschillende fases van training, om de ratten geleidelijk de gedragstaak aan te leren. Het trainingsschema is inmiddels bij verschillende ratten toegepast en loopt routinematig in het lab. De leercurves voor de gedragstaak (~30-60 dagen na operatie) vertonen variatie per rat, maar zijn goed voorspelbaar. Met de videobeelden is bevestigd, dat de ratten zowel tijdens de Go trials als de No-Go trials de snorharen gebruiken om de positie van het object te bepalen. Het doel van deze metingen is om de activiteit van corticale lagen en verschillende gebieden in kaart te brengen als de rat een complexe, aangeleerde gedragstaak vertoont. De vergelijking tussen corticale activiteit tussen eenvoudig en aangeleerd gedrag zal belangrijke inzichten verschaffen over de functie van individuele corticale lagen in verschillende hersengebieden.

Methode bij 2 en 3 is elektrofysiologie.

Het eenvoudige of complexe gedrag dient als cruciale factor voor het bestuderen van individuele corticale lagen of celtypes. Uiteindelijk is het gedrag een middel om de functie van individuele of populaties van neuronen te bepalen door middel van elektrofysiologische metingen. De functie van verschillende corticale lagen zal bestudeerd worden met behulp van multi-unit elektrodes waarmee de activiteit (actie potentiaal frequentie) van meerdere neuronen in verschillende corticale lagen tegelijk opgenomen kan worden. Deze multi-unit metingen zullen aangevuld worden met single-unit (loose-patch) afleidingen in combinatie met post mortem identificatie en reconstructie. De single of multi-unit electrode zal in het desbetreffende corticale gebied gepositioneerd worden via een kleine opening in de schedel en actie potentiaal frequentie zal offline gekwantificeerd worden in combinatie met gedragsanalyse. De single-unit afleidingen zijn eenmalig, de multi-unit elektrodes betreft metingen die herhaald kunnen worden per dier. De elektrofysiologische metingen leveren een schat aan informatie op over de activiteit van individuele en populaties neuronen tijdens de verschillende fases van eenvoudig en complexe gedragstaak.

4. Optogenetische interventie.

De experimenten waarin eenvoudig of complex gedrag gecombineerd wordt met elektrofysiologie en/of neuronale reconstructies zullen zeer inzichtelijk zijn voor de ***correlatie*** tussen neuronale activiteit in specifieke corticale lagen en gedrag. Deze correlatie-experimenten zijn cruciaal om de corticale lagen te identificeren die betrokken zijn bij het uitvoeren van de gedragstaak. Om een direct ***causaal*** verband te kunnen leggen tussen activiteit in belangrijke lagen en gedrag zal er in dit laatste deel van de experimenten gerichte controle van neuronale activiteit plaatsvinden door middel van optogenetische interventie en zal het effect op gedrag gekwantificeerd worden. Er zal lokaal (in één hersengebied, één corticale laag) een virus geïnjecteerd worden dat in de opeenvolgende weken leidt tot de expressie van een lichtgevoelig kanaal in de excitatoire neuronale populatie (pyramidaal neuronen), dat bij activatie door een LED leidt tot remming van activiteit. Deze optogenetische interventie geeft de mogelijkheid om met milliseconde-resolutie een specifieke corticale laag "uit" te zetten. Deze benadering zal gecombineerd worden met de gedragstaken ten einde een causaal verband te kunnen leggen tussen neuronale activiteit in individuele corticale lagen (en/of celtypes) en het uitvoeren van de ~~de~~ taken. De correlatie-experimenten zullen inzicht geven in de corticale lagen die betrokken zijn bij de detectie-, keuze- en beloningsmomenten. De optogenetische interventie zal toegepast worden op basis van de eerder opgedane kennis over de tijdspunten waarop specifieke lagen actief zijn tijdens eenvoudig en

complex gedrag.

Tijdens de experimenten zal een LED gemonteerd worden aan de elektrofysiologie electrode, zodat de optogenetische interventie online bevestigd kan worden. De eerder genoemde meetomstandigheden (elektrofysiologie en gedrag) zullen exact hetzelfde blijven en de metingen zullen herhaald worden in ieder dier. Na afloop van het experiment zal er post-mortem histologie uitgevoerd worden om de locatie van virusinjectie en dus optogenetische interventie te bevestigen.

Overzicht dierproeven:

- Subdoel 1: Morfologie
- [redacted]

- Subdoel 2: Elektrofysiologie in combinatie met eenvoudig gedrag
- [redacted]

- Subdoel 3: Elektrofysiologie in combinatie met complex gedrag (Go/No-Go)
- [redacted]

- Subdoel 4: Manipulatie van gedrag door beïnvloeding van neuronale activiteit
- [redacted]

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.

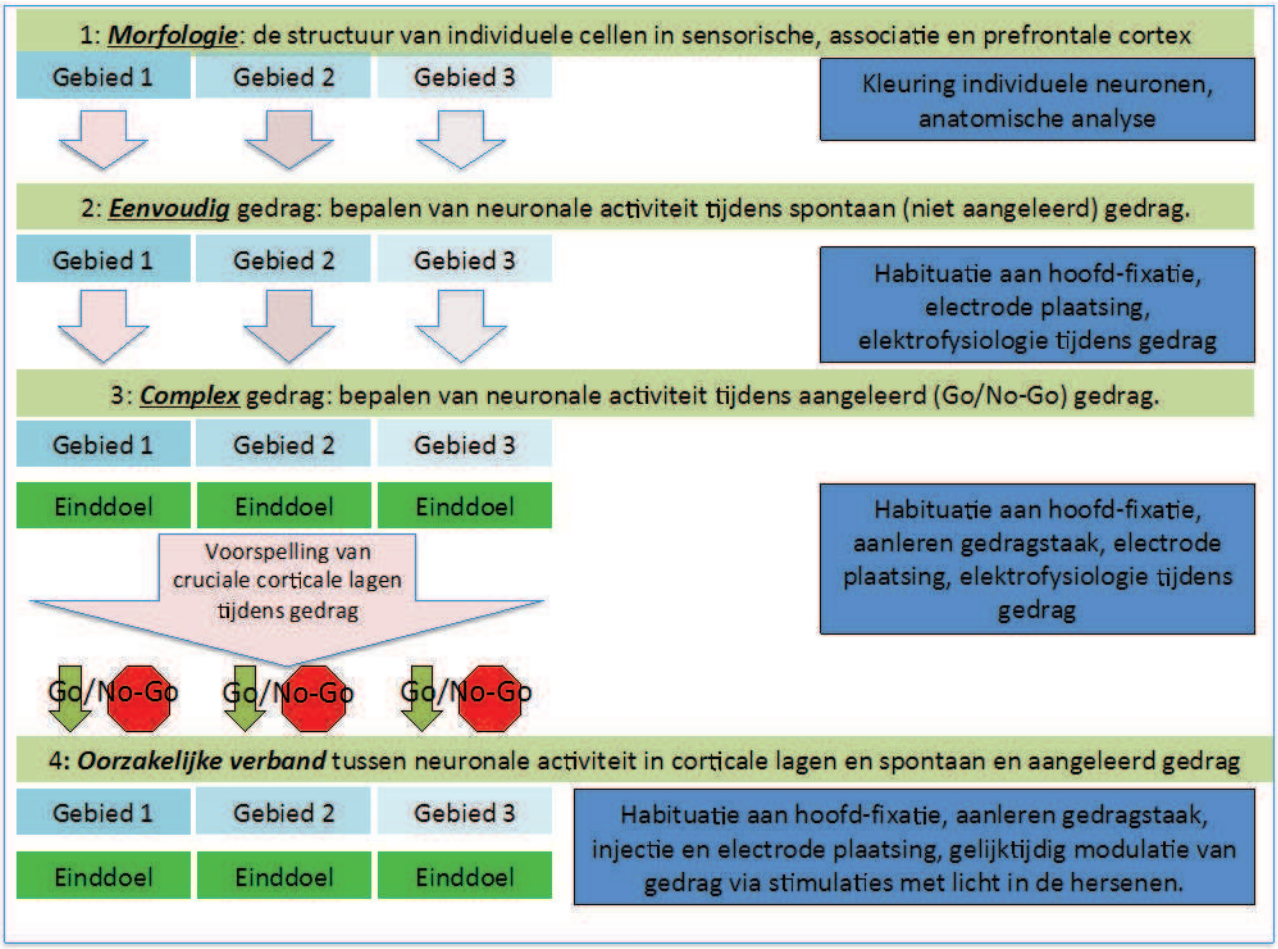
1. Morfologie
Als eerste zal onderzocht worden wat de morfologische kenmerken zijn van celtypes in de corticale lagen van de drie hersengebieden, die relevant zijn voor de gedragstaken (Figuur 4). De morfologie experimenten geven inzicht in de structuur van individuele neuronen en de locatie van deze neuronen ten opzichte van de corticale lagen. Vervolgens zullen er elektrofysiologische metingen gemaakt worden in de corticale lagen voor de functionele identificatie van celtypes. De morfologie experimenten zullen zodoende voorspellend zijn voor het type cel dat gemeten kan worden in de verschillende corticale lagen. De morfologie experimenten hoeven niet afgerond te zijn op het moment dat de elektrofysiologie gestart wordt, aangezien het succes van de elektrofysiologie experimenten niet afhankelijk is van de morfologie experimenten.

2. Elektrofysiologie in combinatie met eenvoudig gedrag.
De bijdrage van corticale lagen aan gedrag wordt allereerst bestudeerd tijdens spontaan, niet-aangeleerd gedrag. Dit deel van de experimenten geeft ons inzicht in de bijdrage van corticale lagen en celtypes aan eenvoudig, aangeboren gedrag. Er zal met name gekeken worden naar verschillen in de functie van hetzelfde celtype uit drie verschillende corticale gebieden. De volgende fase van het project is om de functie van dezelfde corticale lagen en celtypes in kaart te brengen tijdens complex, aangeleerd gedrag. De experimenten uit subdoel 2 zullen een eerste indicatie geven van belangrijke lagen bij eenvoudig gedrag. Deze lagen zullen geprioriteerd worden bij de metingen waarbij de functie van corticale lagen bestudeerd wordt tijdens aangeleerd, complex gedrag.

3. Elektrofysiologie in combinatie met complex gedrag.
De kennis over de activiteit van corticale celtypes, lagen en gebieden tijdens eenvoudig, niet aangeleerd gedrag zullen de basis vormen voor de volgende fase in het project waarin de activiteit van dezelfde corticale celtypes, lagen en gebieden zal worden bestudeerd tijdens complex, aangeleerd gedrag. Dit complexe gedrag vereist de aandacht van de rat en de rat heeft geleerd dat gewenst gedrag leidt tot beloning. De complexe gedragstaak zal een grotere bijdrage eisen van de relevante hersengebieden en de verwachting is dan ook andere neuronale activiteit waar te nemen tijdens gedragsveranderingen. Ook bij dit subdoel zullen de morfologische reconstructies voorspellend zijn voor de celtypes die

elektrofysiologisch beschreven worden tijdens aangeleerd gedrag. Tijdens de analyse van neuronale activiteit zal er met name gekeken worden naar veranderingen in activiteit tijdens detectie-, keuze- en beloningsmomenten.

4. Manipulatie van neuronale activiteit en het uitlezen van het effect op gedrag.
De interventie experimenten zullen gestart worden zodra bekend is welke corticale lagen in de verschillende hersengebieden een robuuste correlatie laten zien tussen veranderingen in activiteit en eenvoudig/complex gedrag. De interventie experimenten zullen vervolgens gericht worden op de lagen waar de grootste absolute of relatieve veranderingen waar te nemen zijn in relatie tot detectie-, keuze- en beloningsmomenten (Go-moment in project). Er zullen geen interventie experimenten uitgevoerd worden aan lagen, die geen verandering in activiteit lieten zien tijdens eenvoudig of complex gedrag (No-Go moment in project). Door toepassing van optogenetische interventie op specifieke momenten van de taak is het mogelijk de neuronale activiteit te remmen en het gedrag te beïnvloeden. Er zal op deze manier een direct oorzakelijk verband aangetoond kunnen worden tussen activiteit van morfologische geïdentificeerde celtypes en gedrag.



Figuur 4: Opbouw van overkoepelende project met samenhang tussen subdoelen en Go/No-Go momenten. De subdoelen 1.Morfologie, 2. Eenvoudig gedrag, 3. Complex gedrag en 4. Oorzakelijk verband. De project onderdelen worden toegelicht in de verschillende bijlagen van het projectvoorstel.

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

Volgnummer	Type dierproef

1	Morfologie
2	Eenvoudig gedrag
3	Complex gedrag
4	Optogenetische interventie
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	*Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden*
1.2	Looptijd van het project	5 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	cortex/corticale netwerken, hersengebieden

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 hersenschors (cortex) is onderdeel van onze grote hersenen en betrokken bij een groot aantal hersenfuncties, zoals het nemen van beslissingen, het bewust verwerken van zintuiginformatie of het coördineren van bewegingen. Onze cortex is onderverdeeld in deelgebieden met ieder een eigen onderliggende taak, maar het is niet bekend hoe de organisatorische eigenschappen van corticale deelgebieden van elkaar verschillen en welke verschillen bijdragen aan het uitvoeren van specifieke hersenfuncties.

Het corticale netwerk is opgebouwd uit verschillende bouwstenen (de hersencellen), en de verschillende bouwstenen zijn van elkaar te onderscheiden op basis van specifieke kenmerken op het gebied van structuur (morfologie) en functie (elektrische activiteit).

De vraag die centraal staat in het huidige project is:

"Wat zijn de kenmerken van de individuele bouwstenen (structuur en functie) waaruit verschillende corticale gebieden zijn opgebouwd."

Binnen dit project zullen de structuur en functie van individuele bouwstenen worden onderzocht in drie hersengebieden die betrokken zijn bij verschillende hersenfuncties. [redacted].

Het uiteindelijke doel van dit project is om fundamentele kennis te vergaren over de overeenkomsten èn verschillen in structuur en functie van de bouwstenen uit verschillende corticale gebieden. Dit zal de basis zijn voor het formuleren van algemene bouwprincipes waarmee corticale netwerken worden opgebouwd en uiteindelijk functioneren. Dit is een cruciale stap in het proces om betere behandelingen te ontwikkelen bij hersenziektes waarbij de corticale functies zijn verminderd, zoals ziekte van Alzheimer, ziekte van Parkinson, autisme of ADHD.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Het project heeft op korte termijn voornamelijk een fundamenteel wetenschappelijk karakter en heeft als doel de kennis over de structuur en functie van verschillende corticale celtypes, lagen en gebieden te vergroten. De maatschappelijke toepassingen van de vergaarde kennis kunnen dan op de lange termijn worden gerealiseerd. Met de kennis over individuele bouwstenen in verschillende deelgebieden van het gezonde brein ontstaan er nieuwe mogelijkheden om hersenziektes te bestuderen om zo betere therapeutische behandelingen of meer doelgerichte medicatie te ontwikkelen om hersenfuncties te herstellen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Bijlage 1 (morfologie): 120
Bijlage 2 (eenvoudig gedrag): 285
Bijlage 3 (complex gedrag): 137
Bijlage 4 (optogenetische interventie): 81

In totaal worden maximaal 623 ratten in dit project gebruikt.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

Alle ratten zullen een operatie ondergaan. Een deel van de ratten zal onder anesthesie blijven tijdens de procedure en niet ontwaken (terminaal ongerief). Ratten die ontwaken om aan gedragstaken deel te kunnen nemen, ondervinden matig ongerief als gevolg van de operatie, met name tijdens het ontwaken en herstel. Daarnaast worden de wakkere dieren met het hoofd vastgezet in een proefopstelling. Dit zogenaamde fixeren geeft vooral in de eerste paar sessies stress en ongerief, maar ratten wennen hier gauw aan. Een deel van de dieren zal ook tijdens dit fixeren beperkt water krijgen om hun gedrag tijdens het onderzoek te sturen door middel van beloning (met water). Dit zorgt bij de dieren voor voldoende motivatie om de dagelijkse behoefte aan water te verdienen met het uitvoeren van de gedragstaak. De ratten raken zeer snel gewend doordat alle procedures zijn gestandaardiseerd, de tijden van het trainingsschema voorspelbaar zijn en ze worden beloond na afloop van fixatie. Door de beloning ontstaat een positieve associatie met de onderzoeker en alle ratten vertonen na verloop van enkele dagen gedrag dat niet meer te onderscheiden is van ratten, die vrij rond bewegen.

3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Bij 20% van de dieren is er sprake van terminaal ongerief en bij 80% van de dieren is er sprake van maximaal matig ongerief.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De ratten worden na de proeven gedood om de structuur van de corticale hersencellen met een microscoop te kunnen bestuderen.

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.	Cognitie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin ook de zintuigsystemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij horende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het zintuigorgaan als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen bij een levend dier worden uitgevoerd. Zeer basale vraagstukken (zoals morfologische eigenschappen van individuele hersencellen) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier worden uitgevoerd bij het verdoofde dier om het ongerief zoveel mogelijk te beperken. Er bestaan tot nu toe geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie niet te bestuderen. Ook bestaan er nog geen computermodellen die aandacht kunnen simuleren of op een biologisch relevante manier informatieverwerking in corticale netwerken kunnen nabootsen. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er intussen wel een samenwerking opgezet met makers van computermodellen die gebruik maken van onze resultaten met verdoofde dieren. Recent zijn de eerste eenvoudige vraagstellingen met behulp van het model onderzocht en beantwoord zonder gebruik te hoeven maken van proefdieren. Het computermodel zal doorlopend uitgebreid en verbeterd worden met als doel dierproeven te verminderen of in enkele gevallen zelfs te vervangen.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Bij het onderzoek passen wij statistische methodes toe om te voorkomen dat er teveel dieren worden gebruikt. Dit doen wij met onze proefopzet met o.a. 1) meerdere metingen per dier, 2) parallele metingen van meerdere hersencellen voor hoge opbrengst van aantal metingen per dier en 3) herhaalde metingen in de tijd die erop is gericht een minimaal aantal dieren te gebruiken voor het beantwoorden van onze onderzoeksvraag. Als de gehoopte resultaten van de experimenten hoger blijken dan bij aanvang van het onderzoek ingeschat, zullen niet alle dieren worden 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.	Het doel van het onderzoek is om de structuur en functie van corticale bouwstenen te karakteriseren en meer inzicht te krijgen in het aansturen van gedrag door verschillende corticale hersengebieden. Dit onderzoek kan niet uitgevoerd worden bij eenvoudige organismen zoals fruitvliegen en slakken, omdat deze dieren niet beschikken over een soortgelijke cortex. Aangezien we met dit onderzoek fundamentele aspecten van intelligent gedrag en onderliggende hersennetwerken bij mensen willen onderzoeken, is het enige alternatief één van de meest geschikte modeldieren, namelijk

de rat. [redacted] Zeer ervaren onderzoekers voeren het onderzoek uit, en zij maken daarbij gebruik van gestandaardiseerde en geoptimaliseerde procedures om de omstandigheden tijdens het onderzoek stabiel te houden en de resultaten van verschillende metingen onderling vergelijkbaar te maken.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Het project richt zich op de organisatorische kenmerken van corticale circuits. Om dit te kunnen onderzoeken, hebben we elektrofysiologische metingen nodig van hersencellen tijdens het uitvoeren van een gedragstaak. Dit betekent dat de rat wakker en alert moet zijn. Het dier wordt vooraf aan het experiment uitgebreid getraind en beloond tijdens de trainingen om stress tijdens het experiment en daaruit volgend ongerief tot een minimum te beperken. Alle handelingen worden te allen tijde uitgevoerd door gekwalificeerd en zeer ervaren personeel. Bij de operaties wordt algehele anesthesie en effectieve pijnbestrijding toegepast. Voordat meer dan matig ongerief optreedt worden de humane eindpunten toegepast. In de praktijk komt dit maar bij <1% van de experimenten voor. Tenslotte zijn de trainingen voorspelbaar en verblijven de ratten een kooi die verrijkt is met geschikt nestmateriaal, speeltjes en een huisje, zodat ze zoveel mogelijk hun natuurlijke gedrag kunnen blijven voortzetten.

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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Morfologie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vraagstelling: wat zijn de morfologische kenmerken van individuele bouwstenen (hersencellen) in verschillende corticale hersengebieden?

Uitkomstparameters: individuele hersencellen zullen worden gevuld met een kleurstof, zodat deze hersencellen na histologische kleuring digitaal gereconstrueerd kunnen worden. Dit levert zeer gedetailleerde informatie op over de dendritische en axonale architectuur, zoals lengte (in micrometer), aantal vertakkingen, locatie van vertakking, aantal primaire dendrieten, en lengte van individuele segmenten (in micrometer). De reconstructie zal worden geschaald naar een gestandaardiseerd referentiekader, zodat de positie bepaald kan worden in het netwerk en werkhypotheses kunnen worden ontwikkeld over de input/output verbindingen op basis van dendritische en axonale morfologie.

De procedure betreft een kleuring van individuele neuronen in verdoofde ratten. [redacted]. De biocytine kleuring is relatief eenvoudig onder stabiele meetomstandigheden (in verdoofde ratten), maar is zeer uitdagend in wakkere dieren vanwege de relatief instabiele meetomstandigheden. De ervaring leert dat biocytine kleuringen in wakkere, alerte dieren voldoende is voor reconstructie van de dendritische architectuur, maar stabielere omstandigheden zijn nodig voor het succesvol kleuren van de dunnere axonen, omdat meer kleurstof in de cel geïnjecteerd dient te worden. Een deel van de morfologie experimenten van het overkoepelende project zal om deze reden aan diep verdoofde dieren worden uitgevoerd om de volledige structuur van individuele neuronen in kaart te kunnen brengen (cellichaam, dendrieten, axon).

Deze methode heeft geleid tot zeer gedetailleerde informatie over de structuur van individuele bouwstenen

[redacted]. Om de resultaten maximaal vergelijkbaar te maken voor de drie corticale gebieden wordt wederom bewust gekozen voor biocytine kleuring van individuele neuronen in systemisch verdoofde ratten. Gezien de hoge mate van standaardisatie van de procedure zal in alle gevallen biocytine gebruikt worden als kleurstof.

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 normaal gehuisvest tot de start van het experiment. Er zal inhalatie anesthesie worden gebruikt om de dieren in een roes te brengen, en systemische anesthesie om een algehele narcose te bewerkstelligen.

Ter aanvulling van de systemische narcose wordt tijdens de operatie uit voorzorg lokale anesthesie toegepast.

De experimenten duren maximaal 6 uur (gerekend vanaf inhalatie anesthesie tot uiteindelijke doden van het dier voor ex vivo histologie).

Experimentele procedure
Er zal een kleine opening in de schedel gemaakt worden om een extracellulaire afleiding te maken van één enkele cel en vervolgens zal de cel gevuld worden met biocytine om de cel post mortem te kunnen identificeren en reconstrueren. Het brein zal in secties van 100 µm gesneden worden voor de identificatie en reconstructie van de gekarakteriseerde cel.

Per dier zal één neuron gekleurd worden voor de digitale morfologische reconstructie. Deze benadering is een arbeidsintensieve benadering, maar omdat intracorticale projecties zeer complex zijn, is het niet mogelijk meerdere cellen per dier te kleuren voor reconstructie Wanneer meerdere neuronen in hetzelfde dier gekleurd worden, is het niet mogelijk betrouwbaar de (seriële) reconstructies te maken.

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

De experimenten zullen zich richten op projectie neuronen [redacted], [redacted]. In laag[redacted] zijn twee dominante type (excitatoire) output cellen aanwezig: 1) simpele 5A cellen en 2) complexe 5B cellen. De simpele cellen projecteren naar het striatum en motor cortex en de complexe cellen projecteren naar verschillende sub-corticale gebieden (oa. de thalamus of de pontine nuclei in de hersenstam). [redacted]. [redacted].

Dit betekent vier experimentele groepen (oftewel 4 celtypes):

1. [redacted]

[redacted].

In de overige experimenten zal de biocytine kleuring voldoende zijn voor reconstructie van de dendrieten, maar onvoldoende zijn voor reconstructie van het axon. Deze experimenten zullen dan gebruikt worden om ons computermodel verder uit te bouwen. Op deze manier zullen de dieren voor meerdere projecten gebruikt kunnen worden.

B. De dieren

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

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximaal aantal: 120, leeftijd: 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

Een gedetailleerde kwantificatie van structuur heeft aangetoond dat de anatomische kenmerken van het somatosensorische (snorhaar) systeem in de cortex significant verschilt tussen mannetjes en vrouwtjes. Daarnaast is aangetoond dat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. De gedragstaak gaat uit van informatieverwerking in dit systeem en de Go/No-Go taak moet worden uitgevoerd met behulp van somatosensorische informatie. Er zullen dus alleen mannetjes worden gebruikt in de experimenten van bijlage 1-4 om uit te sluiten dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus. [redacted]. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden, kunnen fysiologische en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden.

[redacted]. Naar alle waarschijnlijkheid is het zodoende niet mogelijk betrouwbare conclusies te kunnen trekken met slechts n = 5 per type in PFC of PPC. Een veilige schatting is om uit te gaan van 10 reconstructies in plaats van 5 reconstructies per celtype voor de vergelijking. Hierbij moet aangegeven worden dat er minder reconstructies gemaakt zullen worden mochten de uiteindelijke verschillen prominent genoeg zijn om de analyse met minder reconstructies te doen. Wanneer wordt uitgegaan van 10 reconstructies per celtype, zullen er 4 x 10 = 40 cellen nodig zijn. Aangezien 1 op de 3 experimenten succesvol is, betekent dit 40 x 3 = 120 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:

De organisatorische principes van corticale gebieden kan het best bestudeerd worden in een experiment waarin individuele neuronen intact zijn, dus in vivo, in het levende dier. Zeer basale vraagstukken (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier, worden in het verdoofde dier uitgevoerd om mogelijk ongerief te beperken. Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders

dan de levende diermodellen, om een dergelijke onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Ook bestaan er geen computermodellen die de vraagstellingen zouden kunnen beantwoorden. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met programmeurs die gebruik maken van de resultaten met verdoofde dieren om tot een computermodel van het corticale circuit te komen.

Deze samenwerking betreft het ontwikkelen van een computermodel, dat de morfologie én de elektrische activiteit beschrijft van de somatosensorische cortex. Dit model is volledig gebaseerd op de experimenten aan verdoofde dieren en zal in de toekomst kunnen dienen voor het verfijnen of zelfs vervanging van experimenten. Deze vergunningsaanvraag over de organisatorische kenmerken van corticale gebieden zal naadloos aansluiten op ons eerdere werk, en de nieuwe onderzoeksgegevens zullen dan ook direct bijdragen aan het verbeteren en aanvullen van het computermodel met belangrijke nieuwe gegevens.

Vermindering:
Onze ervaring met soortgelijke experimenten [redacted] heeft geleid tot een optimale strategie met een helder doel voor ogen en een duidelijke focus op de belangrijke parameters die gekwantificeerd moeten worden per reconstructie. Statistiek zal vervolgens gebruikt worden om te voorkomen dat meer dieren gebruikt worden dan nodig.

Verfijning:
De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is. Dit wordt gegarandeerd door middel van algehele verdoving tijdens gehele experiment en lokale pijnbestrijding. De ratten worden voorafgaand aan de ingrepen gehuisvest in verrijkte kooien.

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.

Voorafgaand aan het experiment worden de dieren in paartjes en in verrijkte kooien gehuisvest. Het experiment wordt gestart met inhalatie anesthesie en vervolgens blijven de dieren gedurende het verdere verloop van het experiment onder algehele verdoving. De kans op pijn, lijden en/of angst bij de dieren wordt zodoende geminimaliseerd.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd, omdat de benodigde technische expertise doorgaans niet voorhanden is om de *in vivo* structuur van individuele cellen in kaart te brengen. Door onze leidende positie wereldwijd met deze expertise zijn wij zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en zijn we exact op de hoogte waar hiaten in de kennis bestaan. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek nu succesvol uit te kunnen voeren.

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.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Er is sprake van een experimentele procedure onder totale verdoving.

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met speciaal ontwikkelde stereotactische apparatuur om ongerief zo veel mogelijk te beperken. Tijdens soortgelijke experimenten traden er nooit infecties op van het geopereerde gebied. Geen van de geopereerde dieren moest door complicaties voortijdig worden geëuthanaseerd.

Tabel 1: Ingrepen en ongeriefinschatting bij deze dierproeven.

Procedures	**Category**	**Expected percentage of animals**
1. Ingrepen en doden tijdens transcardiale perfusie onder verdoving.	terminaal	100%, > 5 min

cumulatieve ongerief: terminaal.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Het doden van het dier is essentieel om de *ex vivo* histologische kleuring mogelijk te maken voor de uiteindelijke morfologische reconstructie.

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

- 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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Eenvoudig gedrag

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vraagstelling: wat is de functie van individuele corticale lagen en celtypes in verschillende corticale gebieden [redacted] tijdens eenvoudig, aangeboren gedrag?

Uitkomstparameters: De ratten worden herhaaldelijk blootgesteld aan de meetopstelling en kop-fixatie om te wennen aan de omstandigheden en elektrofysiologische metingen mogelijk te maken. De habituatie leidt ertoe dat de ratten na een aantal sessies gewend zijn aan de omstandigheden en natuurlijk gedrag vertonen. Dit gedrag bestaat uit het spontaan en vrijwillig heen en weer bewegen van de snorharen om de omgeving te verkennen. Dit eenvoudige gedrag (snorhaargebruik en als resultaat contact met object) wordt opgenomen met een snelle camera en gecombineerd met elektrofysiologische metingen van individuele of groepen neuronen. In geval van single-unit metingen wordt de gemeten cel met biocytine gevuld voor post mortem identificatie en reconstructie. De positie van multi-unit metingen wordt vastgesteld aan de hand van een fluoriscente markering op de meetlocatie. De combinatie van 1) gedrag, 2) elektrofysiologie en 3) identificatie van corticale laag/celtype geeft de mogelijkheid om actie potentiaal frequenties in verschillende corticale gebieden zeer nauwkeurig te correleren aan eenvoudig, aangeboren gedrag.

De aanpak om de functie van corticale lagen in verschillende gebieden tijdens *eenvoudig*, natuurlijk gedrag te bestuderen is uniek, aangezien de conventionele aanpak is om dieren (muizen, ratten of zelfs apen) te trainen gewenst gedrag te vertonen. Het gewenste gedrag wordt vervolgens beloond en ongewenst gedrag gestraft, zodat het dier zijn acties gaat aanpassen om de beloning te maximaliseren. Echter, onder deze omstandigheden is het niet uit te sluiten dat 1) corticale activiteit verandert onder invloed van het aanleren van de gedragstaak; 2) het gedrag wordt aangepast om de taak zo goed mogelijk uit te voeren en tenslotte, 3) neurotransmitter circuits in de cortex (zoals dopamine) geactiveerd worden als gevolg van de beloning en invloed hebben op de actiepotentiaal patronen, die gemeten worden. Er is dus heel bewust gekozen om in

dit deel van de aanvraag corticale activiteit en functie van lagen/celtypes te bestuderen tijdens eenvoudig, aangeboren gedrag waarbij de hiervoor genoemde processen geen rol spelen.

[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 zullen individueel gehuisvest worden in verrijkte kooien (huisje, speeltjes en nestmateriaal om de leefomstandigheden te optimaliseren) met voedsel en water *ad libitum*. Na trainingssessies zullen de ratten een speciale voedselbeloning krijgen.

De operatie wordt onder algehele inhalatie narcose uitgevoerd. Ter aanvulling en uit voorzorg wordt lokale pijnbestrijding gebruikt. Tijdens de operatie wordt op de schedel een kleine, solide metalen cilinder bevestigd, die het mogelijk maakt de kop te fixeren. Daarnaast wordt een plastic, holle cilinder aangebracht bovenop het corticale gebied waarvan gemeten zal worden ([redacted]). Dit maakt het mogelijk om een opening in de schedel te maken en vervolgens de opening te beschermen door het afsluiten van de cilinder met de schroefdop. Op de dag van het experiment (dag 5) wordt de schroefdop verwijderd om toegang te krijgen tot de opening.
De totale tijdsduur van de operatie is ongeveer 2 uur, waarna de rat geleidelijk en vanzelf zal ontwaken.

Gedurende de dagen na de operatie (dag 1 – 4, gewenning fase) zal de rat tweemaal daags getraind worden om gewend te raken aan kop-fixatie en de experimentele omstandigheden. Dit houdt in dat de rat in de stereotax wordt geplaatst en de kop gefixeerd. De rest van de rat wordt niet vast gezet tijdens het experiment. Om stress zoveel mogelijk te reduceren, zal het dier onder een oppervlakkige roes met inhalatie anesthesie gebracht worden om het plaatsen in de stereotax te vergemakkelijken. De duur van de kop-fixatie zal aanvankelijk slechts 5 min zijn, maar gedurende de daarop volgende trainingssessies zal dit opgevoerd worden naar 25 min. Tijdens het uiteindelijke experiment zal de rat in de stereotax geplaatst worden voor de elektrofysiologische meting van neuronale activiteit en verwerking van zintuiginformatie. [redacted]. Dit wordt, voorafgaand aan het wakkere dier experiment, in het verdoofde dier bepaald door de corticale response op mechanische beweging van de snorharen te meten. Vervolgens wordt de inhalatie verdoving stopgezet, waarna de rat wakker wordt en de neuronale activiteit gemeten kan worden tijdens normaal gedrag (actieve beweging van de snorharen en object touch). Tijdens de elektrofysiologische meting zal de beweging van de snorharen opgenomen worden met een snelle camera.

In geval van een single unit meting zal na de fysiologische karakterisatie de cel gevuld worden met biocytine voor post mortem identificatie. Bij multi-unit metingen zal post mortem de locatie van de meting vastgesteld worden aan de hand van een fluoriscente markering. Aan het eind van het experiment (het uiteindelijke experiment duurt maximaal 60 min) zal het dier onder systemische narcose gebracht worden voor perfusie. Het brein zal in secties van 100 µm gesneden worden voor de identificatie en reconstructie van de gekarakteriseerde cel of vaststelling van meetlocatie.

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

[redacted]

[redacted]

[redacted]**)**
Dit project richt zich op laag 4, 5A en L5B met de wens ± 10 geïdentificeerde cellen per groep te hebben om betrouwbare statistiek uit te voeren. [redacted].

[redacted] Wij willen twee types experimenten doen, waarbij we tegelijk óf in dezelfde laag van alle drie de subgebieden, óf in alle drie de lagen van hetzelfde subgebied afleidingen doen. In eerdere publicaties van andere laboratoria die experimenten met een enkele tetrode hebben gedaan, zijn 20-30 ratten per experimentele groep gebruikt. Onze experimenten zijn echter technisch uitdagender doordat wij meerdere tetrodes plaatsen, waardoor de kans op het niet-optimaal geplaatst zijn van één van de tetrodes groter is en de data van het experiment niet volledig gebruikt kunnen worden. Daarentegen denken wij ook dat door de dubbele sampling van elke laag in elk subgebied (eenmaal tegelijk met andere lagen in hetzelfde subgebied en eenmaal met dezelfde laag in andere subgebieden) wij het aantal dieren per groep kunnen terugbrengen tot 15, zonder te verliezen aan statistische significantie.

De getallen worden met de IvD afgestemd en er zal gebruik gemaakt worden van de Mann-Whitney of t-test voor vergelijkingen tussen celtypes en de ANOVA test voor vergelijkingen tussen dezelfde celtypes van meerdere hersengebieden.

B. De dieren

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

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximaal aantal 285 [redacted]), 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

[redacted]
De metingen zullen aan de 5 verschillende lagen in de cortex worden verricht voor [redacted] Voor betrouwbare statistiek aan fysiologische eigenschappen (Mann-Whitney of t-test) zijn ± 10 (geïdentificeerde) cellen nodig per groep. Dit resulteert in 2 (condities) x 1.5 (succesrate) x 10 (cellen) x 5 (lagen) = 150 dieren.

[redacted]
Dit project richt zich op laag 4, 5A en L5B met de wens ± 10 geïdentificeerde cellen per groep te hebben.
Met een succesrate van 2 op 3 (67%) komt het aantal aangevraagde proefdieren op:
3 celtypes x 10 cellen per celtype = 30 cellen, 1 cel per rat
30 x 1.5 = 45

[redacted] Dit betekent dat we 3 (subgebieden) * 2 (type meting) * 15 = 90 dieren nodig hebben.

Er zullen alleen mannetjes worden gebruikt, omdat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. Aangezien de gedragstaak uitgaat van informatieverwerking door het somatosensorische systeem, en de Go/No-Go taak (bijlage 3) uitgevoerd moet worden met behulp van somatosensorische informatie, moet er uitgesloten worden dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Voor het uitbreiden van het computermodel is het van cruciaal belang om de diersoort en leeftijd constant te houden. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden kunnen fysiologische

en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

Codering van sensorische informatie in het brein kan alleen bestudeerd worden in een experiment waarin zowel het sensorische orgaan (bijv. de snorharen) als de relevante hersengebieden aanwezig zijn (in dit geval hersenstam, thalamus en sensorische cortex). Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Zeer basale vraagstellingen (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier heb ik in het verleden altijd in het verdoofde dier bestudeerd om zoveel mogelijk ongerief te beperken (bijlage 1).

Ter beantwoording van complexere vraagstukken worden zo min mogelijk dieren gebruikt en wordt ongerief voor de gebruikte dieren tijdens het experiment zo veel mogelijk beperkt (bijlage 2-4).

Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. Ook bestaan er geen computermodellen die de vraagstellingen zouden kunnen beantwoorden. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met computer programmeurs die gebruik maken van de resultaten. Recent zijn de eerste computersimulaties gepubliceerd en het doel is om dit model te gebruiken voor het formuleren van gerichte hypotheses, hetgeen kan leiden tot vermindering, en op termijn wellicht tot vervanging van proefdieren.

Vermindering:

Per hersengebied wordt bepaald of single- of multi-unit elektrofysiologie de meest efficiënte benadering is voor het bereiken van de einddoelen met zo min mogelijk dieren. Op de data zal statistiek worden toegepast en niet meer dieren worden gebruikt dan noodzakelijk. Daarnaast wordt bij iedere meting de exacte locatie bepaald door middel van post mortem histologie. Dit leidt tot een vermindering in variatie van de data en dus betrouwbaardere statistiek. Dit leidt eveneens tot een lager aantal benodigde dieren.

Verfijning:

De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is. Daarnaast heeft het betrokken team heel veel ervaring met dit type experimenten en hebben wij de experimentele procedure (operatie, habituatie en meting) tot in detail verfijnd.

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.

Tot het moment van de operatie worden de dieren in paartjes gehuisvest, inclusief kooiverrijking (huisje, nestmateriaal, speeltjes, knaaghoutje).

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel

mogelijk te beperken in combinatie met algehele anesthesie en lokale pijnbestrijding. Wij hebben daarnaast een kleine kooi ontwikkeld voor in de meetopstelling, waarin het dier zich redelijkerwijs comfortabel kan voelen tijdens het experiment.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd, omdat de benodigde technische expertise doorgaans niet voorhanden is om de elektrische activiteit te meten van individuele neuronen in ratten die een gedragstaak uitvoeren en deze vervolgens te vullen met een kleurstof. Door onze leidende positie wereldwijd op dit gebied zijn wij zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en we zijn exact op de hoogte waar hiaten in de kennis voortbestaan. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek succesvol nu uit te kunnen voeren.

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 ratten zullen conventioneel gehuisvest worden tot de start van het experiment (in paren, incl. kooiverrijking). Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

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.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding. Wanneer de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gecontroleerd op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

De ratten vertonen vrijwillig, natuurlijk gedrag. Hierdoor is het niet nodig de dieren te motiveren dit gedrag te vertonen door middel van waterrestrictie, zoals in bijlage 3 wordt toegepast.

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.

Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen implantaat zal de rat worden gedood.

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.

Soort ongerief:
De experimenten omvatten een operatie onder algehele verdoving waarna de rat zal ontwaken. Vervolgens zal de rat getraind worden om te wennen aan kop-fixatie voor het uiteindelijke experiment. Tijdens het volledige experiment zijn er verschillende fases en gradaties van ongerief te verwachten.

A) Licht ongerief (dag 0):
Inductie van inhalatie verdoving voor de operatie kan licht ongerief veroorzaken.

B) Matig ongerief (dag 0):
Tijdens het ontwaken uit volledige narcose zijn de dieren gedurende ongeveer 1 uur duizelig en/of gedesoriënteerd.

C) Licht ongerief (dag 0-5):
Tijdens de operatie wordt aan de schedel een metalen cilinder vastgeplakt waarmee de ratten vastgezet kunnen worden bij hun kop.

D) Matig ongerief (dag 2 - 5):
Het implantaat is noodzakelijk om de ratten vast te kunnen zetten bij hun kop voor de elektrofysiologische metingen. Zeer bewust wordt ervoor gekozen om de rest van het dier niet vast te zetten tijdens het

experiment (zoals mogelijk met een lichaamsharnas). Bewegingsbeperking van de kop is daarentegen wel matig ongerief en daarom zullen de ratten langzaam worden gewend aan deze vorm van vrijheidsbeperking. Aanvankelijk worden de ratten kort vastgezet (5 min). Tijdens volgende sessies wennen de dieren hieraan en wordt de tijd opgeschroefd (30 min). Na afloop van iedere sessie krijgen de dieren een speciale voedsel-beloning.

Tijdens de proef wordt intensief gewerkt met de ratten om volledig vertrouwd te zijn met de experimentele procedure (head-fixatie). De kooien zijn verrijkt met een huisje, speeltjes en nestmateriaal om omstandigheden in de kooi te optimaliseren. Na iedere trainingssessie krijgen de dieren een speciale voedselbeloning. De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel mogelijk te beperken. Wij hebben bijvoorbeeld een kleine kooi ontwikkeld waarin de rat zich redelijkerwijs comfortabel kan voelen tijdens het experiment. Ten slotte wordt er perioperatieve pijnbestrijding toegepast.

Cumulatief ongerief: matig.

Tabel 1: Ingrepen en ongeriefinschatting bij deze dierproeven.

Procedures	**Ongerief**	**Aantal dieren (%)**	**Duur**
1. Transport naar experimentele ruimte	licht	100%	< 5 min
2. Induceren van inhalatie anesthesie	licht	100%	3-5 min
3. Implanteren van metalen cilinder op schedel onder systemische verdoving	licht	100%	2 uur
4. Ontwaken uit inhalatie anesthesie	matig	100%	± 1 uur
5. Kop-fixatie (trainingen met oplopende duur)	kort matig, na training licht	100%	5 – 30 min
6. Kop-fixatie in combinatie met elektrofysiologie	matig	100%	max. 45 min
7. Doden tijdens transcardiale perfusie onder verdoving	terminaal	100%	>5 min

Het cumulatieve ongerief per dier zal matig niet overschrijden.

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.

Transcardiale perfusie is een essentieel onderdeel van de proef om het brein te fixeren en klaar te maken voor de histologische procedure. In geval van single-unit metingen wordt tijdens de histologie de aangekleurde cel zichtbaar gemaakt voor digitale reconstructie; bij multi-unit metingen wordt de fluorescente markering zichtbaar gemaakt om de meetlocatie vast te stellen.

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

- 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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3 Type dierproef: Complex gedrag

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vraagstelling: wat is de functie van individuele corticale lagen en celtypes in verschillende corticale gebieden ([redacted]) tijdens complex, aangeleerd gedrag?

De eenvoudige gedragstaak (bijlage 2) en complexe gedragstaak (bijlage 3) worden naast elkaar gebruikt om de organisatorische kenmerken van corticale netwerken te bestuderen. [redacted].

Uitkomstparameters: Tijdens de experimenten meten we actiepotentialen van populaties neuronen, terwijl de rat de aangeleerde gedragstaak uitvoert. Door de netwerkactiviteit van individuele of populaties neuronen in [redacted] te koppelen aan bepaalde aspecten van gedrag (zintuig informatie, nemen van beslissing, krijgen van beloning) willen we achterhalen welke rol(len) de verschillende corticale lagen en celtypes in verschillende subgebieden van de cortex spelen bij de codering van detectie-, keuze- en beloningsprocessen.

[redacted]

- [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.

Alle dieren zullen in paren of groepen worden gehuisvest in het dierenverblijf van het instituut en zullen tot aan de trainingsfase *ad libitum* toegang hebben tot water en voedsel. Tijdens de trainingsfase wordt overgeschakeld op waterbeperking. Deze waterbeperking is tijdelijk en heeft geen enkele negatieve gevolgen. De rat zal water tijdens de trainingssessies kunnen verdienen door middel van het correct uitvoeren van de gedragstaak. De ratten zullen een implantaat op hun schedel bevestigd krijgen, waarmee de kop gefixeerd kan worden in een speciaal daarvoor ontwikkelde stereotact. Vervolgens zullen de ratten over de duur van enkele dagen worden getraind om te kunnen wennen aan de experimentele omstandigheden en om de gedragstaak succesvol uit te voeren.

Tijdens de taak zal *aangeleerd* intelligent gedrag (maken van beslissing) leidend zijn in ons experiment. Deze gedragstaak betreft een go/no-go keuze waarbij de ratten de snorharen gebruiken voor het lokaliseren van een object. Wanneer het object in de "go" positie staat (proximale positie van object), wordt likken beloond met een waterbeloning; staat het object in de "no-go" positie (distale positie van object), dan krijgt de rat geen beloning bij likken, of zelfs een milde straf in de vorm van een tijdspauze. Deze go/no-go taak is jarenlang uitontwikkeld door bevriende labs en wij hebben de afgelopen maanden veel tijd geïnvesteerd om de opstelling zo aan te passen dat het ongerief voor de ratten minimaal is (verfijning) en de experimenten zo stabiel mogelijk zijn (vermindering).

Operatie:
De operatie wordt op dag 0 onder algehele inhalatie anaesthesie uitgevoerd. Ter aanvulling en uit voorzorg wordt lokale pijnbestrijding toegepast. [redacted]. In geval van een acuut electrofysiolgie experiment wordt een plastic, holle cilinder aangebracht bovenop het corticale gebied van interesse. Dit maakt het mogelijk om een opening in de schedel te maken en vervolgens de opening te beschermen door het afsluiten van de cilinder met de schroefdop. Verder wordt op de schedel een kleine, solide metalen cilinder bevestigd, die het mogelijk maakt de kop te fixeren. De operatie zal ~ 2 uur in beslag nemen.
Ter voorbereiding van chronische electrofysiologie wordt tijdens één en dezelfde operatie zowel een multi-unit probe geimplanteerd als de head-post geplaatst. De implantatie van de chronische probe geeft de mogelijkheid om tijdens opeenvolgende trainingssessies de activiteit van corticale lagen te bestuderen en is een aanvullende benadering op de acute (single en multi-unit metingen). De voorbereidende operatie voor chronische afleidingen zal ~ 6 uur in beslag nemen.

Na de operatie worden de dieren individueel gehuisvest in verrijkte kooien (huisje, speeltjes en nestmateriaal om de leefomstandigheden te optimaliseren) met voedsel en water *ad libitum*.

Beschrijving go/no-go taak:
Wij zullen de rat trainen een objectlocatie te herkennen en die te rapporteren door middel van het likken aan een likpoort met watervoorziening. Tijdens deze taak zal het object relatief proximaal (Go, dus likken), of in de relatief distale (No-Go, dus niet likken) locatie gepositioneerd worden.
Wij hebben de apparatuur in intensief contact met deze specialisten custom ontworpen en hebben alles op maat laten maken. Hierbij hebben we verschillende ongerief verminderende eigenschappen aangebracht, zoals een houder waarin het lichaam van de rat gedurende de training en het experiment zit. Hierdoor is geen lichaamsharnas nodig en heeft de rat het gevoel dat hij in een veilige kleine ruimte zit. Verder hebben we een ergonomisch randje aan laten brengen, waarop de rat zijn voorpoten kan zetten, zodat hij zich tijdens fixatie in een natuurlijke rusthouding bevindt. De rat wordt zeer geleidelijk getraind waardoor er geen aversie optreedt met de opstelling. De omstandigheden zijn zo gemaakt, dat de ratten vrijwillig de houder ingaan voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond worden voor gewenst gedrag.

Om de trainingsfase zo voorspoedig en zo natuurlijk mogelijk te laten verlopen willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en leert de rat dat de trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

Op de dag van het experiment wordt single of multi-unit electrofysiologie gecombineerd met het uitvoeren van de gedragstaak. De activiteit binnen de verschillende corticale lagen zal worden gecorreleerd aan de prestatie tijdens de taak, met likken tijdens een 'Go' trial en niet likken tijdens een 'No-Go' trial als teken voor aandacht en het maken van de juiste keuze. Corticale activiteit tijdens trials met ongewenst gedrag (likken tijdens 'No-Go' of niet likken tijdens 'Go' trials) zullen vervolgens vergeleken voor trials met correct gedrag.

Na de elektrofysiologische metingen zal het dier onder systemische verdoving gebracht worden voor transcardiale perfusie en ex vivo histologie zal worden uitgevoerd om de precieze locatie van de meetelektrodes ten opzichte van de corticale lagen en anatomische subgebieden vast te stellen, of voor celtype identificatie in geval van single-unit elektrofysiologie. Verder zullen we offline spike sorting toepassen om de actiepotentialen van individuele neuronen uit de populatie responses te kunnen isoleren.

Samenvatting

- Stap 1: Operatie. Op de kop van de rat wordt onder algehele anesthesie en onder plaatselijke verdoving een headpost aangebracht en wordt een craniotomie gemaakt, waarop ter bescherming een plastic cilinder wordt bevestigd.
- Stap 2: Herstelperiode waarin de rat in suikerwater gedrenkte voedselpellets krijgt om voedsel- en wateropname te stimuleren. Op de avond van dag 2 wordt de waterfles weg genomen.
- Stap 3: Leren van de mogelijkheid water te verkrijgen uit de likpoort. Elke lik aan de likpoort resulteert in onmiddellijk openen van de waterdruppelaar. Twee trainingen van een uur, of totdat de rat 5 ml/sessie heeft verdiend.
- Stap 4: Detectie van het object leren rapporteren: de rat krijgt alleen water als hij likt nadat het object in de go positie was. Hierbij mag de rat 100 ms na het verschijnen van het object likken en krijgt hij 5 seconden de tijd. Twee trainingen van een uur of 5 ml/sessie. Bij vals alarm klinkt na de eerste 10 goede trials een alarmgeluid en vindt er een 3 seconde time-out plaats. Op de avond van dag 7 krijgt de rat weer een waterfles.
- Stap 5: Training zoals bovenstaand totdat de rat tijdens twee opeenvolgende sessies minstens 85% correct rapporteert, met verschil dat de rat binnen 2 seconden moet rapporteren.
- Experimentele dag: Elektrofysiologische karakterisatie van de functie van individuele corticale lagen en celtypes tijdens het uitvoeren van de gedragstaak.

De Go/No-Go taak is gebaseerd op de sensorische verwerking van een stimulus en de daarop volgende beslissing die wordt gemaakt om al dan niet te likken. Door de gedragstaak te standaardiseren (eenvoudige èn complexe taak) en deze gedragstaak te combineren met karakterisatie van activiteit in de corticale lagen [redacted], zal het mogelijk zijn in detail te beschrijven hoe de verschillende corticale gebieden bijdragen aan 1) aangeboren en 2) aangeleerd gedrag.

Uitval

[redacted] Gezien de reeds aanwezige expertise zijn er geen redenen om aan te nemen dat er uitval zal optreden door post-operationele trauma's, of dat dieren ziek zouden worden door de procedure.

Individuele dieren kunnen uitvallen tijdens de trainingen als het dier duidelijk niet gewend raakt aan fixatie, maar in de praktijk komt dit zelden voor (<1 % van de ratten). Daarnaast wordt er -na overleg met experts- rekening gehouden met 10% uitval van ratten, omdat deze de taak niet leert. Voor het toetsen van gewenning zal het gedrag van het dier tijdens de fixatie worden bekeken. Daarnaast wordt het aantal keutels geteld tijdens de fixatie (hoeveelheid is sterke indicatie voor stress) en zal, voorafgaand aan iedere ochtendtraining, het lichaamsgewicht worden gemeten.

De experimentele procedure van fixeren en gedragstraining is tot in detail verfijnd en het ongerief van de ratten te allen tijde geminimaliseerd.

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

[redacted] Wij willen twee type experimenten doen waarbij we tegelijk óf in dezelfde laag van alle drie de subgebieden, óf in alle drie de lagen van hetzelfde subgebied afleidingen doen. In eerdere publicaties van andere laboratoria die experimenten met een siliconprobe met een enkele 'shank' hebben gedaan, zijn 20-30 ratten per experimentele groep gebruikt. Onze experimenten zijn echter technisch uitdagender doordat wij meerdere shanks plaatsen, waardoor de kans op het niet-optimaal geplaatst zijn van één van de shanks groter is en de data van het experiment niet volledig gebruikt kan worden. Daarentegen denken wij ook dat door de dubbele sampling van elke laag in elk subgebied (eenmaal tegelijk met andere lagen in hetzelfde subgebied en eenmaal met dezelfde laag in andere subgebieden) wij het aantal dieren per groep terug kunnen brengen, zonder te verliezen aan statistische significantie.

[redacted]. De metingen in S1 zijn iets uitdagender dan de metingen in de PFC, omdat de shanks zowel in als tussen de 'barrel-kolommen' van S1 terecht kunnen komen en alleen ín de barrel-kolommen kan de relevante informatie gemeten worden. In het geval dat één van de meet-elektrodes niet in de barrel, maar net ernaast terecht komt, kunnen we niet met zekerheid zeggen of de gemeten responsetijd van de neuronen in dat gebied ook daadwerkelijk de responsetijd in S1 weerspiegelt, omdat de gebieden tussen de kolommen de sensorische informatie pas ontvangt na voorbewerking in de barrel-kolom en er dus een kleine vertraging optreedt. Hierdoor denken wij 20 in plaats van 15 ratten per groep te zullen moeten gebruiken.

PPC

[redacted] en de metingen zijn relatief eenvoudig [redacted] zal het einddoel naar verwachting met 15 dieren behaald kunnen worden.

B. De dieren

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

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximaal aantal 137, leeftijd 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

[redacted]

Op basis van 2 type metingen, 3 subgebieden en 15 ratten per deelvraag betekent dit dat we 2 * 3 * 15 = 90 dieren nodig hebben. Wij verwachten verder, naar aanleiding van gesprekken met collega's die vergelijkbare experimenten in muizen doen en anderen die zowel met muizen als ratten gewerkt hebben, dat ± 10% van de ratten niet goed te trainen is. Dit betekent dat we in totaal 100 dieren nodig hebben. Mocht het in een later stadium nodig zijn dit aantal aan te passen (meer of minder dieren dan de voorgestelde 100), dan rapporteren wij dat terug.

[redacted]

Uitgaande van 1) 15 benodigde ratten voor het behalen van het subdoel, 2) 5 ratten extra vanwege mogelijke plaatsing naast het gewenste gebied en 3) 10% uitval van ratten, die niet goed getraind blijken te kunnen worden, komt het totaal op 20 * 1,1 = 22 ratten [redacted]

[redacted]

15 ratten inclusief de 10% aan dieren die moeite met de taak hebben.

Er zullen alleen mannetjes worden gebruikt, omdat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. Aangezien de gedragstaak uitgaat van informatieverwerking door het somatosensorische systeem, en de Go/No-Go taak (bijlage 3) uitgevoerd moet worden met behulp van somatosensorische informatie, moet er uitgesloten worden dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Voor het uitbreiden van het computermodel is het van cruciaal belang om de diersoort (Wister rat) en leeftijd (P25-P40) constant te houden. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden kunnen fysiologische en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Intelligentie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin ook de sensorische systemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij behorende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het sensorische orgaan (bijv. de snorharen) als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Zeer basale vraagstukken (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier zijn in het verleden altijd in het verdoofde dier uitgevoerd om ongerief te beperken (bijlage 1).

Ter beantwoording van complexere vraagstukken worden zo min mogelijk dieren gebruikt en wordt ongerief voor de gebruikte dieren tijdens het experiment zo veel mogelijk beperkt (bijlage 2-4).

Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes, of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie of het maken van keuzes niet te bestuderen. Ook bestaan er nog geen computermodellen die een biologisch relevante simulatie van aandacht kunnen genereren. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met computerprogrammeurs die gebruik maken van onze resultaten met verdoofde dieren om een biologisch realistisch netwerk van de cortex "in silico" te reconstrueren. Dit computermodel zou zich op termijn uitermate goed kunnen lenen om basale vraagstukken te beantwoorden.

Vermindering

In [redacted] is de relatie tussen gedrag en activiteit veel moeilijker waarneembaar en wordt de correlatie met name op populatieniveau waargenomen. Een benadering met single-unit elektrofysiologie zou een zeer groot aantal dieren vereisen. In [redacted] wordt in dit geval zeer bewust gekozen voor multi-unit afleidingen om grote aantallen cellen per dier te meten (48-96 cellen per dier vs. 2 cellen per dier in afleidingen van individuele cellen). Dit gaat ten koste van het niet volledig kunnen achterhalen van de neuronale morfologie, maar is de meest efficiënte manier om het einddoel te bereiken met gebruik van een beperkt aantal dieren.

Verder zal statistiek worden toegepast om de einddoelen te kunnen bereiken met een minimaal aantal dieren.

Verfijning
De huidige aanvraag richt zich op de vraag hoe intelligent gedrag zich verhoudt tot de netwerkactiviteit [redacted]. Om deze vraag te beantwoorden hebben we afleidingen nodig van cellen tijdens cognitief gedrag, wat betekent dat de rat wakker moet zijn. Het dier wordt vooraf aan het experiment getraind en beloond tijdens de trainingen om stress tijdens het experiment en daaruit volgend ongerief tot een minimum te beperken.
De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is. [redacted]. Daarnaast krijgen de ratten een kooi die verrijkt is met geschikt nesting materiaal en een huisje, zodat ze zoveel mogelijk hun natuurlijke gedrag kunnen uiten. De rat wordt zeer geleidelijk getraind waardoor er geen aversie optreedt met de opstelling. De omstandigheden zijn zo gemaakt, dat de ratten vrijwillig de houder ingaan voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond worden voor gewenst gedrag. Het dier beëindigt vervolgens de proef als de motivatie omlaag gaat.

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.

Tot het moment van de operatie worden de dieren in paartjes gehuisvest inclusief kooiverrijking (huisje, nestmateriaal, speeltjes, knaaghoutje).

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel mogelijk te beperken in combinatie met algehele anesthesie en lokale pijnbestrijding. Wij hebben daarnaast een kleine kooi ontwikkeld voor in de meetopstelling, waarin het dier vrijwillig in gaat zitten en zich comfortabel kan voelen tijdens het experiment.

Ten slotte wordt perioperatieve pijnbestrijding toegepast.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Door onze leidende positie wereldwijd op dit gebied zijn wij zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en zijn we exact op de hoogte waar hiaten in de kennis bestaan. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek nu succesvol uit te kunnen voeren.

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 ratten zullen conventioneel gehuisvest worden tot de start van het experiment (in paren, incl. kooiverrijking). Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

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.

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding. Wanneer de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gecontroleerd op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In uitzonderlijke gevallen kan er infectie optreden van het operatieve gebied (<5%). Mocht dit voorkomen, zal kortstondig (enkele dagen) antibioticum gegeven worden.

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.

Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen implantaat zal de rat worden gedood.

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

<5 %

K. Classificatie van ongerief

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

Cumulatief ongerief: matig.

Soort ongerief:
De experimenten omvatten een operatie onder algehele verdoving waarna de rat zal ontwaken. Vervolgens zal de rat getraind worden om te wennen aan kop-fixatie voor het uiteindelijke experiment. Tijdens het volledige experiment zijn er verschillende fases en gradaties van ongerief te verwachten.

A) Licht / geen ongerief (dag -14 – 0)
Habituatie trainingen, interactie met onderzoeker, dagelijks handelen.

B) Licht ongerief (dag 0):
Inductie van inhalatie anesthesie voor de operatie kan licht ongerief veroorzaken.

C) Matig ongerief (dag 0):
Tijdens het ontwaken uit volledige narcose zijn de dieren gedurende ongeveer 1 uur duizelig en/of gedesoriënteerd.

D) Licht ongerief (dag 3-7 en 10-14)
Om de rat te motiveren deel te nemen aan de gedragstaak wordt de rat op waterbeperking gezet. Deze waterbeperking is tijdelijk en heeft geen enkele negatieve gevolgen. Vooraf aan de training worden de ratten gewogen. Mochten de ratten niet genoeg water weten te verdienen om op gewicht te blijven, dan wordt dit los van de trainingssessies handmatig aangevuld. Het ongerief als gevolg van de tijdelijke wateronthouding is geschat als "licht" na overleg met collega's die zeer veel ervaring hebben met trainingen en wateronthouding in muizen en ratten.

E) Matig ongerief (dag 2 - 14):
Het implantaat is noodzakelijk om de ratten vast te kunnen zetten bij hun kop voor de elektrofysiologische metingen. Om onspecifieke stress tijdens de trainingsfase te vermijden, willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en leert de rat dat de trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

F) Licht ongerief (dag 0-14):
Na implantatie van de head-post moeten wij de rat solitair huisvesten om te voorkomen dat de kooigenoten de wond vervuilen en infecties veroorzaken. De kooi waarin de rat gehuisvest wordt is voorzien van veel voorzieningen om het ongerief tot een minimum te beperken. Zo krijgt de rat een huisje om zich in terug te trekken, bedding materiaal om een nest mee te bouwen en verschillende speeltjes als kooiverrijking.

G) Licht ongerief (dag 2 – dag #):
Uitvoeren van gedragstest.

H) Matig ongerief (dag 14):
Facultatief en alleen relevant voor acute elektrofysiologie: Operatie onder inhalatie anesthesie om craniotomie schoon en open te maken (verwijderen dura mater) en de opening in de schedel voor te bereiden op de acute elektrofysiologie meeting. Dit is een korte operatie (~30 minuten).

I) Licht ongerief (dag 15 – dag #)
Acute elektrofysiologie: Experimentele dag, eenmalige meting. Het plaatsen van de acute single- of multi-unit probe geeft licht ongerief aangezien de rat zich bewust is van de extra handeling. Echter, na het plaatsen van de probe vertoont de rat weer het gewenste gedrag en gaat over tot het uitvoeren van de gedragstaak.
Chronische elektrofysiologie: Experimentele dagen, herhaalde metingen (maximum 40 dagen, 2x per dag). Het uitvoeren van de gedragstaak en het aankoppelen van de chronische meet-elektrodes.

J) Licht ongerief (dag 14):
Het doden van het dier door middel van transcardiale perfusie gebeurt onder volledige anesthesie.

Tabel 1: Ingrepen en ongeriefinschatting bij deze dierproeven.

Procedures	Ongerief	Aantal dieren (%)	Duur
1. Transport naar experimentele ruimte	licht	100%	< 5 min
2. Induceren van inhalatie anaesthesie	licht	100%	3-5 min
3. Implanteren van metalen cylinder op schedel onder volledige verdoving	licht	100%	2 uur
4. Ontwaken uit inhalatie anaesthesie	matig	100%	± 1 uur
5. Tijdelijke waterrestrictie (waterconsumptie wordt dagelijks aangevuld)	licht	100%	max 16 uur gedurende max 40 dagen
6. Kop-fixatie (trainingen met oplopende duur)	kort matig, na training licht	100%	5 – 30 min.
7. Solitaire huisvesting	licht	100%	meerdere dagen
8. Uitvoeren gedragstaak	licht	100%	< 1 uur
9. Induceren van inhalatie anaesthesie	licht	50%	3-5 min
10. Craniotomie openen voor acute meting	licht	50%	1 uur
11. Ontwaken uit inhalatie anaesthesie	matig	50%	1 uur
12a. Kop-fixatie met acute elektrofysiologie	matig	50%	< 1 uur
12b. Kop-fixatie met chronische elektrofysiologie (maximum 40 dagen, 2x per dag)	matig	50%	± 1 uur (metingen worden herhaald)
13. Doden tijdens transcardiale perfusie onder verdoving	terminaal	100%	>5 min

Het cumulatieve ongerief per dier zal matig niet overschrijden.

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.

Transcardiale perfusie met paraformaldehyde is een essentieel onderdeel van de proef om het brein te fixeren en klaar te maken voor de post mortem histologische procedure. In geval van single-unit metingen wordt tijdens de histologie de aangekleurde cel zichtbaar gemaakt voor digitale reconstructie; bij multi-unit metingen (acuut en chronisch) wordt de fluorescente markering zichtbaar gemaakt om de meetlocatie vast te stellen.

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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VU Universiteit Amsterdam
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: Optogenetische interventie tijdens complex gedrag

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vraagstelling: wat is het causale verband tussen activiteit in individuele corticale lagen in verschillende corticale gebieden [redacted]) tijdens complex, aangeleerd gedrag?

De complexe taak (Go/No-Go) wordt gebruikt om corticale codering van gedrag [redacted] te kwantificeren (zie bijlage 3). De optogenetische interventie geeft de mogelijkheid om de meest belangrijke (= meest actieve) corticale laag/lagen kortstondig te inactiveren teneinde het effect van optogenetische interventie op gedrag in detail te kunnen bepalen.

Uitkomstparameters: Ratten zullen getraind worden voor het uitvoeren van de complexe gedragstaak (Go/No-Go). Tijdens de operatie zal er in het corticale gebied van interesse zeer lokaal een virusinjectie geplaatst worden. Deze virusinjectie leidt tot de expressie van een lichtgevoelig eiwit in de neuronale populatie dat als aan/uit schakelaar gebruikt kan worden voor neuronale activiteit. Een ledlicht zal bevestigd worden aan de elektrofysiologische meet-elektrode (geen extra ingrepen of verandering van ongerief) en per trial zal dit ledlicht het lichtgevoelige eiwit (en dus de neuronen) aan/uit kunnen zetten. Het doel is om gelijktijdig 1) de activiteit van de corticale lagen in kaart te brengen tijdens het uitvoeren van de gedragstaak door middel van de chronische multi-unit elektrofysiologie en 2) het gevolg van de optogenetische interventie te bepalen op het uitvoeren van de gedragstaak.

De resultaten uit subdoel 3a-c (corticale activiteit tijdens complex gedrag, zie projectvoorstel 3.4.2) zullen ontmaskeren welke lagen in de drie corticale gebieden [redacted]) een cruciale rol vertolken tijdens het gedrag (toename van neuronale activiteit). Daarnaast zullen wij met subdoel 3a-c ontdekken op welke momenten in de gedragstaak de toename in activiteit maximaal is. De spatiotemporele karakteristieken (corticale laag en momenten tijdens gedrag) van de optogenetische interventie zullen dus worden

afgestemd op de activeitspatronen, die tijdens subdoel 3a-c worden gemeten. Het effect van de interventie (subdoel 4) wordt vervolgens bepaald aan de hand van het functioneren tijdens de gedragstaak (o.a. hoe goed de taak wordt uitgevoerd voor Go/No-Go trials).

Subdoel 4 is van cruciaal belang om de overkoepelende doelstelling van deze aanvraag te bereiken door te onderzoeken of de correlaties die gevonden worden tussen eenvoudig en complex gedrag en corticale activiteit terug te voeren zijn op een causaal verband tussen neuronale activiteit in een specifieke laag van [redacted] en intelligent gedrag.

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

De behandeling van de dieren is vergelijkbaar met de experimenten die beschreven zijn in bijlage 3 aangezien het gaat om het aanleren van een complexe gedragstaak. Echter, voor subdoel 4 (optogenetische interventie) zal er tijdens de operatie voor de chronische elektrofysiologie een klein volume virus worden geïnjecteerd in het brein van de rat.

Samengevat worden de dieren na operatie individueel gehuisvest in verrijkte kooien met voedsel en water *ad libitum*. Tijdens de trainingsfase wordt overgeschakeld op waterbeperking. Deze waterbeperking is tijdelijk en heeft geen enkele negatieve gevolgen. De rat zal water tijdens de trainingssessies kunnen verdienen door middel van het correct uitvoeren van de gedragstaak. De waterbeperking is tijdelijk en ratten ondervinden hier geen hinder van. Om de rat tijdens de training precies in dezelfde positie te plaatsen en om stabiele elektrofysiologische afleidingen te kunnen doen, zullen de ratten een implantaat op hun schedel bevestigd krijgen, waarmee de kop gefixeerd kan worden in een speciaal daarvoor ontwikkelde stereotact. Tijdens de operatie wordt een multi-unit elektrode geïmplanteerd waarop een kleine optische fiber is bevestigd (diameter ~100 micrometer). Na de operatie zullen de ratten worden getraind om te wennen aan de experimentele omstandigheden en om de gedragstaak succesvol uit te voeren. De ratten gaan na verloop van tijd vrijwillig de houder in voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond te worden voor gewenst gedrag.

Tijdens de taak zal aangeleerd intelligent gedrag leidend zijn (maken van de juiste keuze). De gedragstaak betreft de Go/No-Go keuze waarbij de ratten de snorharen gebruiken voor het lokaliseren van een object (zie bijlage 3). Wanneer het object in de "Go" positie staat (proximale positie van object), wordt likken beloond met een waterbeloning; staat het object in de "No-Go" positie (distale positie van object), dan krijgt de rat geen beloning bij likken of zelfs een milde straf in de vorm van een tijdspauze.

Operatie:
De operatie wordt onder inhalatie narcose uitgevoerd. Ter aanvulling en, uit voorzorg, wordt lokale en peri-operatieve pijnbestrijding toegepast. Met behulp van anatomische coördinaten wordt [redacted] gelocaliseerd. Dit maakt het mogelijk om een opening in de schedel te maken voor chronische implantatie van een multi-unit electrode en een kleine, solide metalen cilinder te bevestigen, die het mogelijk maakt de kop te fixeren.

Virusinjectie:
Voorafgaand aan de implantatie van een chronische multi-unit electrode zal een kleine pipet gevuld met virus met behulp van de stereotact in de hersenen worden ingebracht en zal een kleine hoeveelheid virus worden geïnjecteerd (enkele nanoliters). De pipet zal worden teruggetrokken, waarna er verder gegaan zal worden met het plaatsen van de multi-unit probe inclusief ledlicht voor de activatie van lichtgevoelige eiwitten. De lichtbundel bestaat uit een uiteinde dat in hersenen geplaatst wordt en een uiteinde met een bevestigingspunt voor de externe kabel.

Go/No-Go taak (zie ook bijlage3):
Wij zullen de rat trainen een objectlocatie te herkennen en die te rapporteren door middel van het likken aan een likpoort met watervoorziening.

Om de trainingsfase zo voorspoedig en zo stressloos mogelijk te laten verlopen, willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en de rat leert dat de

trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

Tijdens de eindfase van het experiment (de rat voert de taak goed uit) wordt het uitvoeren van de gedragstaak gecombineerd met multi-unit elektrofysiologie en optogenetische interventie. Optogenetische interventie zal worden gebruikt om de corticale laag/lagen tijdens een specifiek moment van de gedragstaak te remmen. De werkhypothese is dat dit een direct effect heeft op het gedrag, omdat de corticale laag zijn/haar functie niet kan vertolken. De uitleesparameters zijn het likken tijdens een 'Go' trial en niet likken tijdens een 'No-Go' trial als teken voor aandacht en het maken van de juiste keuze. Corticale activiteit tijdens de trials waarin de rat ongewenst gedrag vertoont (likken tijdens 'No-Go' of niet likken tijdens 'Go' trials) zullen vergeleken worden met corticale activiteit tijdens trials met gewenst gedrag. Met de optogenetische interventie in beide type trials zal zodoende een causaal verband beschreven kunnen worden tussen activatie van corticale gebieden en lagen in relatie tussen verschillende tijdsmomenten in de cognitieve taak.

Aan het eind van de procedure zal het dier onder systemische verdoving worden gebracht voor transcardiale perfusie en ex vivo histologie zal worden uitgevoerd om de precieze locatie van de meetelektrode ten opzichte van de corticale lagen en anatomische subgebieden vast te stellen. Verder zullen we offline spike sorting toepassen om de actiepotentialen van individuele neuronen uit de populatie responses te kunnen isoleren.

Samenvatting

- Stap 1: Operatie. Op de kop van de rat wordt onder algehele anesthesie en onder plaatselijke verdoving een headpost aangebracht en wordt een craniotomie gemaakt, waarop ter bescherming een plastic cilinder wordt bevestigd.
- Stap 2: Herstelperiode waarin de rat in suikerwater gedrenkte voedselpellets krijgt om voedsel- en wateropname te stimuleren. Op de avond van dag 2 wordt de waterfles weggenomen.
- Stap 3: Leren van de mogelijkheid water te verkrijgen uit de likpoort. Elke lik aan de likpoort resulteert in onmiddellijk openen van de waterdruppelaar. Twee trainingen van een uur, of totdat de rat 5 ml/sessie heeft verdiend.
- Stap 4: Detectie van het object leren rapporteren. De rat krijgt alleen water als hij likt nadat het object in de go positie was. Hierbij mag de rat 100 ms na het verschijnen van het object likken en krijgt 5 seconden de tijd. Twee trainingen van een uur of 5 ml/sessie. Bij vals alarm klinkt na de eerste 10 goede trials een alarmgeluid en vindt er een 3 s time-out plaats. Op de avond van dag 7 krijgt de rat weer een waterfles.
- Stap 5: Training zoals bovenstaand totdat de rat tijdens twee opeenvolgende sessies minstens 85% correct rapporteert, met dit verschil dat de rat binnen 2 seconden moet rapporteren.
- Experimentele dagen: Elektrofysiologische karakterisatie van de activiteit van individuele corticale lagen en celtypes tijdens het uitvoeren van de gedragstaak. De optogenetische interventie bestaat uit het random selecteren van trials (Go en No-Go trials) waar het ledlicht wordt aangezet tijdens een specifieke fase van de trial (start-, detectie-, keuze- of beloningsfase).

De optogenetische interventie in combinatie met elektrofysiologische meting en bepaling van gedragsprestatie zal een zeer gedetailleerd beeld geven over het causale verband tussen de activiteit in een corticale laag in een specifiek gebied ([redacted]) en cognitieve prestaties. De kwantitatieve aspecten van optogenetische interventie (timing en duur van interventie) zullen worden bepaald aan de hand van de resultaten uit subdoel 3 (complex gedrag, figuur 4 hoofdaanvraag).

Na afloop van de proef moeten we controleren hoe de elektrodes, lichtbundel of virale injecties geplaatst zijn. Hiervoor wordt het dier transcardiaal geperfuseerd onder algehele anesthesie. Na fixatie worden de hersenen uitgeprepareerd en gesneden voor anatomie. De hersenplakjes zullen vervolgens worden ingebed en klaargemaakt voor analyse.

Uitval

[redacted] Gezien de reeds aanwezige expertise zijn er geen redenen om aan te nemen dat er uitval zal optreden door post-operationele trauma's, of dat dieren ziek zouden worden door de procedure.

Individuele dieren kunnen uitvallen tijdens de trainingen als het dier duidelijk niet gewend raakt aan fixatie, maar in de praktijk komt dit zelden voor (<1 % van de ratten). Daarnaast wordt er -na overleg met experts- rekening gehouden met 10% uitval van ratten, omdat deze de taak niet leert. Voor het toetsen van gewenning zal het gedrag van het dier tijdens de fixatie worden bekeken. Daarnaast wordt het aantal keutels geteld tijdens de fixatie (hoeveelheid is sterke indicatie voor stress) en zal, voorafgaand aan iedere ochtendtraining, het lichaamsgewicht worden gemeten.

De experimentele procedure van fixeren en gedragstraining is tot in detail verfijnd en het ongerief van de ratten te allen tijde geminimaliseerd.

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

Optogenetica:
Wistar ratten, eigen fok of aangekocht van erkende leverancier. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt om de resultaten consequent en vergelijkbaar te houden voor het overkoepelende einddoel. Op basis van soortgelijke experimenten en ervaring met relevante statistiek wordt ingeschat dat er 10 dieren per optogenetische interventiegroep nodig zijn om verschillen in gedrag te kunnen opmerken. Voor de drie hersengebieden ([redacted]) willen we optogenetische interventie toepassen voor de diepe output laag 5 en voor de oppervlakke laag 2/3.

B. De dieren

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

Wistar rat, aangekocht van erkende leverancier, maximum aantal 81, 25-40 dagen oud. Alleen mannetjes zullen worden gebruikt.

Op basis van 3 hersengebieden ([redacted]), twee celtypes per gebied (L2/3 en L5) en 10 ratten per groep betekent dit 3 (hersengebieden) x 2 (lagen) x 10 (dieren) = 60 dieren. Het controle experiment bestaat uit de injectie van een inactief virus en zal in 1 hersengebied toegepast worden (eveneens 10 dieren).

In een deel van de experimenten verwachten we dat de virusinjectie stereotactisch niet optimaal geplaatst is, of houden we rekening met andere factoren die tot uitval kunnen leiden. Uit ervaring kan dit bij ongeveer 15% van de ratten optreden. Dit betekent dat we 15% extra dieren nodig hebben, dus 70*1.15 = 80.5 dieren (70 goed geplaatst, 11 incorrect geplaatst). Totaal aantal dieren: 81 dieren

Er zullen in de experimenten die beschreven zijn in bijlages 1-4 alleen mannetjes worden gebruikt, omdat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. Aangezien de gedragstaak uitgaat van informatieverwerking door het somatosensorische systeem en de Go/No-Go (bijlage 3 en 4) taak uitgevoerd moet worden met behulp van somatosensorische informatie, moet er uitgesloten worden dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus.

Voor het uitbreiden van het computermodel is het van cruciaal belang om de diersoort en leeftijd (P25-P40) constant te houden. Het gebruik van dezelfde diersoort, sexe en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken. De leeftijd 4 – 6 weken is gebaseerd op vergelijkbare experimenten die sinds 2004 lopen. Door dezelfde leeftijd van de dieren aan te houden, kunnen fysiologische en morfologische eigenschappen van corticale neuronen vergeleken worden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:

Cognitie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin ook de sensorische systemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij behorende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het sensorische orgaan (bijv. de snorharen) als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Zeer basale vraagstukken (zoals anatomische projecties) die niet afhankelijk zijn van het bewustzijn van het dier zijn in het verleden altijd in het verdoofde dier uitgevoerd om zoveel mogelijk ongerief te beperken (bijlage 1).

Ter beantwoording van complexere vraagstukken worden zo min mogelijk dieren gebruikt en wordt ongerief voor de gebruikte dieren tijdens het experiment zo veel mogelijk beperkt (bijlage 2-4).

Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes, of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie of het maken van keuzes niet te bestuderen. Ook bestaan er nog geen computermodellen die een biologisch relevante simulatie van aandacht kunnen genereren. Met het oog op de toekomst en de ontwikkeling van alternatieve methodes is er een samenwerking tot stand gekomen met computer-programmeurs die gebruik maken van onze resultaten met verdoofde dieren om een biologisch realistisch netwerk van de cortex "in silico" te reconstrueren. Dit computermodel zou zich op termijn uitermate goed kunnen lenen om basale vraagstukken te beantwoorden.

Vermindering:

Onze proefopzet is erop gericht een minimaal aantal dieren te gebruiken voor het beantwoorden van onze onderzoeksvraag. Indien het slagingspercentage van de experimenten hoger blijkt te liggen, zullen niet alle dieren worden gebruikt. Het controle experiment (inactief virus) zal geinjecteerd worden in 1 hersengebied en als controle kunnen dienen voor alle drie de hersengebieden. Op deze manier hoeft het controle experiment slechts eenmaal uitgevoerd te worden en wordt het totaal aantal dieren verminderd. Ten slotte zullen de resultaten van de experimenten uit bijlage 3 leidend zijn voor de proefopzet van bijlage 4 om met zo min mogelijk dieren een maximaal effect van optogenetische interventie te bewerkstelligen. Dit zal eveneens het aantal benodigde dieren voor het behalen van het einddoel minimaliseren.

Verfijning:

De huidige aanvraag richt zich op het causale verband tussen corticale activiteit en intelligente prestaties. Om deze vraag te beantwoorden, hebben we afleidingen nodig van neuronen tijdens cognitief gedrag in combinatie met optogenetische interventie. Dit betekent dat de rat wakker moet zijn. Het dier wordt vooraf aan het experiment getraind en beloond tijdens de trainingen om stress tijdens het experiment en daaruit volgend ongerief tot een minimum te beperken. De experimenten zijn zo ontworpen dat ongerief geminimaliseerd is en de experimenten beschreven in bijlage 4 worden afgestemd op de resultaten uit bijlages 2 en 3. [redacted]. Daarnaast krijgen de dieren een huisje in de kooi, zodat ze zoveel mogelijk hun natuurlijke gedrag vertonen, inclusief geschikt nesting

materiaal, speeltjes etc. De rat wordt zeer geleidelijk getraind waardoor er geen aversie optreedt met de opstelling. De omstandigheden zijn zo gemaakt, dat de ratten vrijwillig de houder ingaan voor kop-fixatie om vervolgens de taak uit te voeren en beloond worden voor gewenst gedrag. Het dier beëindigt vervolgens de proef als de motivatie omlaag gaat.

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.

Tot het moment van de operatie worden de dieren in paartjes gehuisvest inclusief kooiverrijking (huisje, nestmateriaal, speeltjes, knaaghoutje).

De operatie en het experiment worden uitgevoerd met state-of-the-art technieken om ongerief zo veel mogelijk te beperken in combinatie met inhalatie anesthesie en lokale pijnbestrijding. Wij hebben daarnaast een kleine kooi ontwikkeld voor in de meetopstelling, waarin het dier zich redelijkerwijs comfortabel kan voelen tijdens het experiment. Het ontwerp van de verschillende componenten is gemaakt na overleg met experts in het veld en naar aanleiding van gepubliceerde bevindingen over de standaardisatie, optimalisatie van ergonomie en reproduceerbaarheid van meetomstandigheden.

Adequate anesthesie en perioperatieve pijnbestrijding wordt toegepast.

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.

De optogenetische interventie tijdens de Go/No-Go taak is niet eerder op deze manier uitgevoerd in ratten. Wij zijn zeer goed op de hoogte over gepubliceerd relevant werk en we zijn exact op de hoogte waar hiaten in de kennis voortbestaan, met name in het causale verband tussen laag-specifieke activiteit in verschillende corticale gebieden onder dezelfde gestandaardiseerde gedragsomstandigheden. Ons lab heeft door de jaren heen de relevante expertise en ervaring opgebouwd, en alle benodigde randvoorwaarden zijn aanwezig om dit onderzoek succesvol nu uit te kunnen voeren.

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 ratten zullen voorafgaand aan de operatieve ingreep conventioneel gehuisvest worden tot de start van het experiment (in paren, incl. kooiverrijking). Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

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.

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

Inhalatie- en/of systemische-anesthesie met perioperatieve pijnbestrijding. Wanneer de dieren na een chirurgische ingreep bijkomen uit anesthesie worden ze dagelijks gecontroleerd op hun gewicht, gedrag, uiterlijk en reacties op prikkels.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In uitzonderlijke gevallen kan er infectie optreden van het operatieve gebied (<5%). Mocht dit voorkomen, zal kortstondig (enkele dagen) antibioticum gegeven worden.

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.

Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen implantaat zal de rat worden gedood.

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

<5 %

K. Classificatie van ongerief

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

Cumulatief ongerief: matig.

Soort ongerief:
De experimenten omvatten een operatie onder algehele verdoving waarna de rat zal ontwaken. Vervolgens

zal de rat getraind worden om te wennen aan kop-fixatie voor het uiteindelijke experiment. Tijdens het volledige experiment zijn er verschillende fases en gradaties van ongerief te verwachten. Waar mogelijk wordt ongerief consequent geminimaleerd en is “licht” of “matig”.

A) Licht ongerief (dag -14 – 0)
Habituatie trainingen, interactie met onderzoeker, dagelijks handelen.

B) Licht ongerief (dag 0):
Inductie van inhalatie verdoving voor de operatie kan licht ongerief veroorzaken.

C) Matig ongerief (dag 0):
Tijdens het ontwaken uit volledige narcose zijn de dieren gedurende ongeveer 1 uur duizelig en/of gedesoriënteerd.

D) Licht ongerief (tijdens gedragstraining)
Om de rat te motiveren deel te nemen aan de gedragstaak, wordt de rat op waterbeperking gezet. Vooraf aan de training worden de ratten gewogen. Mochten de ratten niet genoeg water weten te verdienen om op gewicht te blijven, dan wordt dit los van de trainingsessies handmatig aangevuld. Na overleg met collega's, die zeer veel ervaring hebben met trainingen en wateronthouding bij muizen en ratten wordt het ongerief als gevolg van de tijdelijke wateronthouding als “licht” geschat.

E) Matig ongerief (dag 2-14):
Het implantaat is noodzakelijk om de ratten vast te kunnen zetten bij hun kop voor de elektrofysiologische metingen. Om onspecifieke stress tijdens de trainingsfase te vermijden, willen wij dat de rat tijdens de taak al zijn water voor de dag verdient. Dit leidt tot optimaal leergedrag en leert de rat dat de trainingsopstelling een veilige plek is waar water te verdienen valt.

F) Licht ongerief (dag 0-14):
Na implantatie van de head-post wordt de rat solitair gehuisvest om te voorkomen dat de kooigenoten de wond vervuilen en infecties veroorzaken. De kooi waarin de rat gehuisvest wordt, is verrijkt met veel voorzieningen om het ongerief tot een minimum te beperken. Zo krijgt de rat een huisje om zich in terug te trekken, bedding materiaal om een nest mee te bouwen en verschillende speeltjes als kooiverrijking.

G) Licht ongerief (dag 2 – dag #):
Uitvoeren van gedragstest.

H) Licht ongerief (dag 15 - dag #)
Experimentele dagen, herhaalde metingen (maximum 40 dagen, 2x per dag). Het uitvoeren van de gedragstaak, het aankoppelen van de chronische meet-elekrodes en de optogenetische interventie.

I) Terminaal ongerief (eind van de proef):
Het doden van het dier d.m.v. transcardiale perfusie gebeurt onder algehele anesthesie.

Tabel 1: Overzicht van het ongerief bij verschillende ingrepen.

Procedures	Ongerief	Aantal dieren (%)	Duur
1. Transport naar experimentele ruimte	licht	100%	< 5 min
2. Induceren van inhalatie anaesthesie	licht	100%	3-5 min
3. Implanteren van metalen cylinder op schedel, chronische probe, virus injectie onder volledige verdoving.	licht	100%	4 uur
4. Ontwaken uit inhalatie anaesthesie	matig	100%	± 1 uur
5. Tijdelijke waterrestrictie (waterconsumptie wordt dagelijks aangevuld)	licht	100%	max 16 uur gedurende max 40 dagen
6. Kop-fixatie (trainingen met oplopende duur)	kort matig, na training licht	100%	meerdere dagen
7. Solitaire huisvesting	licht	100%	meerdere dagen
8. Uitvoeren gedragstaak	licht	100%	< 1 uur
9. Kop-fixatie met chronische elektrofysiologie en optogenetische interventie (maximum 40 dagen, 2 metingen per dag)	matig	100%	± 1 uur (metingen worden herhaald)
10. Doden tijdens transcardiale perfusie onder verdoving	terminaal	100%	>5 min

Het cumulatieve ongerief per dier zal matig niet overschrijden.

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.

Transcardiale perfusie is een essentieel onderdeel van de proef om het brein te fixeren en klaar te maken voor de post mortem histologische procedure. Tijdens de histologie worden 1) de exacte stereotactische coördinaten van de virusinjectie vastgesteld en 2) de locatie van de multi-unit meetelektrode ten opzichte van de anatomische kenmerken vastgesteld (corticale gebieden en lagen).

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

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

☒ Ja

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
Het NVWA nummer is 11200

2. Titel van het project:
De structuur en functie van corticale netwerken

3. Titel van de NTS:
Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden

4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
   - telefoonnummer contactpersoon:*020-59889038*
   - e-mailadres contactpersoon*: ivd.amd@vu.nl*

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC: : *06-06-2017*
   - ☐ aanvraag compleet: : *06-06-2017*
   - ☐ in vergadering besproken: *13-06-2017*
   - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t*
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *15-06-2017 tot 29-06-2017*
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
   - ☐ aanpassing aanvraag: *11-08-2017*
   - ☐ advies aan CCD: *16-08-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
-Datum advies IvD: *06-06-2017*
-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:*15-06-2017*
- Strekking gestelde vragen*: In de NTS staat nogal veel tekst, focus meer op het wetenschappelijk belang en minder op het maatschappelijk belang; het gaat hier om fundamenteel onderzoek. De DEC vraagt zich af waarom de morfologische typering van celtypes nog nodig is, hier is toch al veel kennis over beschikbaar? Het onderzoek is opgebouwd uit 4 onderdelen, hoe hangen deze onderdelen samen? De nummering in het voorstel is verwarrend. In de bijlagen is het aantal celtypen, het aantal dieren en de mate van ongerief nog niet helder genoeg.*

- Datum antwoord: *29-06-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De aanvraag is aangepast op de bovenstaande punten. Het wetenschappelijk belang is meer benadrukt. de DEC heeft gelijk dat er verschillende zeer belangrijke publicaties zijn geweest over verschillende celtypes, [redacted]. In dit onderzoek ligt de nadruk op de vorm en projectie-gebieden van de complete axonale structuren en juist deze informatie ontbreekt op de open source databases. Het projectvoorstel gaat dus om nieuwe experimenten met nieuwe uitkomsten. er is een sectie toegevoegd aan 3.4.1 om de koppeling tussen elektrofysiologie en morfologie helder te verduidelijken. De nummering is aangepast. De tekst is aangepast om dit te verduidelijken.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

Vraagronde 1
- Datum:*17-07-2017*
- Strekking gestelde vragen*: Er zijn nog enkele tekstuele opmerkingen bij de NTS. In de bijlagen zijn de humane eindpunten en de mate van ongerief nog niet duidelijk genoeg weergegeven.*
- Datum antwoord: *11-08-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De NTS en de bijlagen zijn aangepast.*

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 doelcategorie fundamenteel onderzoek is 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.

Het directe doel van deze studie is fundamenteel inzicht te krijgen in de structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) tijdens gestandaardiseerd gedrag. Dit zal onderzocht worden in drie hersengebieden die betrokken zijn bij verschillende hersenfuncties. [redacted]

Het uiteindelijke doel van de studie op de lange termijn is deze kennis over individuele bouwstenen in verschillende deelgebieden van het gezonde brein te gebruiken voor het ontwikkelen van betere behandelingen van hersenziektes waarbij deze corticale functies zijn verminderd (zoals ziekte van Alzheimer, ziekte van Parkinson, autisme of ADHD). Teneinde betere therapeutische behandelingen of meer doelgerichte medicatie te ontwikkelen om de hersenfuncties van patiënten te herstellen.

Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel in de toekomst 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 patiënten met hersenziektes (waarbij de corticale functies verminderd zijn). De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: De fundamentele kennis zal in de toekomst mogelijk bijdragen aan het ontwikkelen van betere therapeutische behandelingen voor patiënten met hersenziektes.

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 zullen meer inzicht geven in de structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) en deze kennis kan in de toekomst bijdragen aan het beschikbaar komen van betere therapieën voor de behandeling van hersenziekten. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opzet 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. Na het aanbrengen van de cilinder voor kop-fixatie worden de dieren individueel gehuisvest om te vermijden dat ratten bij elkaar aan het operatiegebied gaan krabben en infecties ontstaan.

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. Van alle dieren zal 20% terminaal ongerief en 80% matig ongerief ervaren.

    Alle ratten zullen een operatie onder anesthesie ondergaan. Een deel van de ratten zal onder anesthesie blijven tijdens de procedure en niet ontwaken (20% terminaal ongerief). De ratten die ontwaken om aan gedragstaken deel te kunnen nemen (80%), ondervinden matig ongerief als gevolg van de operatie, met name tijdens het ontwaken en herstel. Daarnaast zal ongerief ontstaan als gevolg van het fixeren van het hoofd (kort matig, na training licht) en tijdens de gedragstest (licht). De ratten raken hier echter snel aan gewend doordat alle procedures zijn

gestandaardiseerd, de testtijden voorspelbaar zijn en omdat de dieren worden beloond na afloop van fixatie. Door de beloning ontstaat een positieve associatie met de onderzoeker en alle ratten vertonen na verloop van tijd gedrag dat niet meer te onderscheiden is van ratten die vrij rond bewegen.

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 gedragstesten in combinatie met hoofdfixatie ondergaan, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe.

De criteria voor humane eindpunten zijn goed gedefinieerd.

Tijdens de terminale proeven is er geen sprake van humane eindpunten (dierproef 1).
Bij dierproef 2, 3 en 4 zullen de dieren een hoofdimplantaat operatie krijgen hierbij gelden de volgende humane eindpunten: Bij gewichtsafname (gewicht komt onder 85% van streefgewicht), afwijkend gedrag of loskomen van het implantaat. De kans hierop is <1% in dierproef 2 en <5 % bij dierproef 3 en 4. Voordat meer dan matig ongerief optreedt worden de humane eindpunten toegepast.

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.

Cognitie is een complex proces waarbij verschillende hersengebieden met elkaar communiceren en waarin de zintuigsystemen een grote rol spelen. Dit betekent dat cognitie en de daarbij horende processen alleen bestudeerd kunnen worden in een experiment waarin zowel het zintuigorgaan als de relevante hersengebieden aanwezig zijn. Dit kan dus alleen in het levende dier gedaan worden. Er bestaan tot op heden geen adequate modellen, anders dan de levende diermodellen, om de onderzoeksvraag te kunnen beantwoorden. In hersenplakjes of gekweekte hersencellen zijn processen als attentie niet te bestuderen. Ook bestaan er tot nu toe nog geen computermodellen die aandacht kunnen simuleren of op een biologisch relevante manier informatieverwerking in corticale netwerken kunnen nabootsen (dit is wel in ontwikkeling en kan mogelijk op termijn het gebruik van dieren verminderen, of in enkele gevallen zelfs vervangen).

De keuze voor het gebruik van rat is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. De cortex van de rat vertoont veel overeenkomsten met de cortex van de mens. En omdat men met dit onderzoek de fundamentele aspecten van intelligent gedrag en de onderliggende hersennetwerken wil onderzoeken, is gekozen voor één van de meest gebruikte diermodellen, namelijk de rat.

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. Er zullen meerdere metingen per dier en herhaalde metingen in de tijd worden uitgevoerd om zo een minimaal aantal dieren te gebruiken voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag.

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 623 ratten 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 onderzoek wordt uitgevoerd door zeer ervaren onderzoekers die gebruik maken van gestandaardiseerde en geoptimaliseerde procedures om variatie tussen individuele experimenten te voorkomen.

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

Bij dit onderzoek zullen alleen mannetjes ratten worden gebruikt. Dit omdat er diverse verschillen bekend zijn tussen mannen en vrouwen bij dit type onderzoek. Er is aangetoond dat de anatomische kenmerken van het somatosensorische (snorhaar) systeem in de cortex significant verschilt tussen mannetjes en vrouwtjes. Daarnaast is aangetoond dat de oestrus cyclus invloed heeft op activiteit in het somatosensorische systeem. De gedragstaak in dit onderzoek gaat uit van informatieverwerking in dit systeem en de Go/No-Go taak moet worden uitgevoerd met behulp van somatosensorische informatie. Er zullen alleen mannetjes worden gebruikt in de experimenten van bijlage 1-4 om uit te sluiten dat er variatie optreedt onder invloed van de oestrus cyclus. Het gebruik van dezelfde diersoort, sekse en ras/stam maakt het mogelijk de resultaten van verschillende experimenten te vergelijken.

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 post mortem histologische 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 structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) tijdens gestandaardiseerd gedrag het gebruik van maximaal 623 ratten die daarvan terminaal 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 terminaal tot maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de corticale netwerken. De waarden die voor patiënten met hersenziekten bevorderd worden: Mogelijk veel voordeel in de toekomst wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen betere therapieën voor de behandeling van hersenziekten.

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 623 ratten, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Om meer kennis te krijgen over de fundamentele aspecten van intelligent gedrag en de functie van onderliggende hersennetwerken is onderzoek in diermodellen noodzakelijk. Er zijn op dit moment nog 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 structuur en functie van verschillende hersengebieden (corticale netwerken) tijdens gestandaardiseerd gedrag. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van kennis is afgewogen tegen het, terminaal 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 623 ratten, 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) Het wetenschappelijk belang is substantieel, daarnaast is er een indirect maatschappelijk belang. De resultaten van dit onderzoek zullen informatie geven over de corticale hersennetwerken tijdens gestandaardiseerd gedrag en kunnen in de toekomst bijdragen aan het beschikbaar komen van een betere behandeling van hersenziekten.

(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 wetenschappelijk belang en het indirecte maatschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 623 ratten en het daarbij verwachte terminale 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.

9.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
[redacted]
van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1120020173084

Bijlagen
2

Datum 21 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 augustus 2017. Het gaat om uw project "De structuur en functie van corticale netwerken". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1120020173084. 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:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

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:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11200
Naam instelling of organisatie:	Vrije Universiteit Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	53815211
Straat en huisnummer:	de Boelelaan 1105
Postcode en plaats:	1081 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

Gegevens gemachtigde

Naam:	[redacted]
Adres:	van der Boechhorststraat 1
Postcode en plaats:	1081 BT AMSTERDAM
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:	31 december 2022
Titel project:	De structuur en functie van corticale netwerken
Titel niet-technische samenvatting:	Onderzoek naar de structuur en functie van verschillende (corticale) hersengebieden
Naam DEC:	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
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:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	13 f functionaris (Proefdierdeskundige)
Plaats:	Amsterdam
Datum:	21 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
[redacted]
van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1120020173084

Bijlagen
2

Datum 21 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 21 augustus 2017
Vervaldatum: 20 september 2017
Factuurnummer: 173084

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1120020173084	€ 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 21 september 2017 15:35
Aan: 'Info-zbo'
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: AVD1120020173084: aanhouden beoordelen

Urgentie: Hoog

Categorieën: Dossier: [redacted]

Geachte CCD,

De antwoorden van de onderzoekers op de onderstaande vragen van de CCD zijn vandaag geupload via de NetFTP verbinding.
Daarnaast hebben de onderzoekers de NTS aangepast, deze is ook naar u verstuurd.

Het gaat hierbij om 2 documenten van: AVD_11200 met de naam: ''3084_CorticaleNetwerken_Reactie_op_vragen CCD.pdf'' en ''3084_CorticaleNetwerken_Niet-technischeSamenvatting_ingekort.pdf''
Graag vernemen we of u deze documenten in goede orde heeft ontvangen.
Mocht er nog meer informatie nodig zijn dan horen we dat graag.

Met vriendelijke groet,
[redacted]

[redacted]

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: woensdag 13 september 2017 10:52
To: [redacted]
Cc: [redacted]
Subject: AVD1120020173084: aanhouden beoordelen

Geachte [redacted],

Op 21 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1120020173084. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- In bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 wordt waterdeprivatie toegepast. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor waterdeprivatie beter te onderbouwen en hierbij aandacht te besteden aan de complexiteit van de opdrachten, het aantal herhalingen en andere mogelijkheden om dieren te trainen (positieve stimulatie). Daarnaast wordt u verzocht de keuze voor de hoeveelheid vloeistof (in relatie tot gewicht en leeftijd van de dieren) en de effecten daarvan op de dieren beter te onderbouwen. Bovendien wordt u verzocht te beschrijven of de dieren volledig hersteld zijn van de operatie voordat de waterfles weggenomen wordt. Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

- De NTS is veel langer dan 500 woorden. U wordt verzocht deze in te korten.

Opsturen binnen veertien dagen

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

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

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 21 augustus 2017 15:55
Aan: [redacted]
CC: [redacted]'
Onderwerp: Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven 1120020173084

Geachte [redacted]

Vriendelijk verwijs ik u naar de brief en de bijlagen.

Deze zal ook per post worden verzonden.

Met vriendelijke groet,

[redacted]

Namens:

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....
T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Amsterdam, 21 September 2017

Betreft: vragen van CCD naar aanleiding van AVD1120020173084

- *In bijlagen 3.4.4.3 en 3.4.4.4 wordt waterdeprivatie toegepast. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor waterdeprivatie beter te onderbouwen en hierbij aandacht te besteden aan de complexiteit van de opdrachten, het aantal herhalingen en andere mogelijkheden om dieren te trainen (positieve stimulatie).*

Reactie opmerking 1: Knaagdieren hebben zich tijdens de evolutie aangepast om goed te kunnen overleven in condities waarin weinig water voorhanden is. Daarnaast is het aangetoond, dat waterrestrictie minder ingrijpend is in verhouding tot calorische restrictie (zie oa. Armstrong et al., 1980 en Rowland, 2007). Om deze redenen is het gebruik van waterrestrictie een nuttig middel om ratten te motiveren deel te nemen aan een gedragstaak (zie oa. Schwarz et al., 2010).

Belangrijk: In onze proefopzet betekent waterrestrictie dat de dieren niet ad libitum water krijgen, maar dat de dieren de dagelijkse behoefte verdienen tijdens het deelnemen aan de gedragstaak op vaste momenten van de dag.

Uitdroging van de rat wordt voorkomen doordat nauwkeurig wordt gemeten hoeveel water wordt verdiend tijdens de gedragstaak. Wanneer het volume water dat wordt verdiend niet voldoende is om op gewicht te blijven, wordt extra water zonder voorwaardes aangeboden ter consumptie. [redacted].

Tijdens de trainingen is de gedragstaak aanvankelijk zeer eenvoudig en is het geen probleem voor de ratten om voldoende water te verdienen. Het hoge aantal herhalingen (~200 trials) van de gedragstaak en herhaalde mogelijkheden (meerdere sessies per dag) om water te verdienen is een 2de garantie waardoor het voor de ratten geen enkel probleem is om de dagelijkse hoeveelheid water te verdienen. Ten slotte kunnen wij de hoeveelheid water per beloningsmoment nauwkeurig vaststellen om te garanderen dat het totale volume van de beloning toereikend is voor de behoefte van de dieren.

Wij hebben ook de mogelijkheid van positieve stimulatie overwogen, al is het niet volledig duidelijk wat de CCD commissie hier bedoelt. Het is geen optie om farmacologische (positieve) beloning te geven omdat dit fundamentele processen in de hersenen beïnvloedt. Het gebruik van suikerwater of andere zoete vloeistoffen is zeer nadelig voor het gebruik van én hygiëne in het lab en kan leiden tot infectiegevaar en vervuiling van de opstelling. Concluderend is beloning met water de meest optimale beloning voor ratten, die door beperkt wateraanbod intrinsiek gemotiveerd zijn om deel te nemen aan de gedragstaak.

- Daarnaast wordt u verzocht de keuze voor de hoeveelheid vloeistof (in relatie tot gewicht en leeftijd van de dieren) en de effecten daarvan op de dieren beter te onderbouwen.

Reactie opmerking 2: Wistar ratten kunnen algehele waterrestrictie gedurende 48 uur zonder blijvende fysiologische veranderingen doorstaan (Armstrong et al., 1980). Onder *ad libitum* condities drinken ratten dagelijks ongeveer 10% van hun lichaamsgewicht (Kissileff et al., 1969). Voor onze ratten (8-24 weken, 280 tot 400 g) zou dit betekenen dat ze 25-35 ml per dag drinken, maar in de praktijk is 12 ml/dag voldoende voor een stabiel lichaamsgewicht en wordt dit volume verdient in 2 of 3 trainingsessies per dag. Uit welzijnsoogpunt willen wij voorkomen dat onze ratten minder dan dit volume ontvangen. Daarom wordt het verdiende volume water nauwgezet bijgehouden en wordt ingegrepen indien een rat op een dag minder dan de 12 ml dreigt te verdienen. Allereerst wordt dit gedaan door een extra trainingssessie toe te voegen aan het programma. Mocht dat niet voldoende zijn, dan wordt de rat het overige water aangeboden in de vorm van in water gedrenkte voedselpellets. Ratten vinden natte pellets zeer aantrekkelijk en eten deze gelijk op. Op deze manier wordt zowel de voedsel- als waterinname gegarandeerd. Mocht dit niet voldoende zijn, wordt de rat eenmalig een dag in een kooi met *ad libitum* water geplaatst. Indien het dier ook hierna te weinig vocht binnen krijgt om op gewicht te blijven, wordt deze uit het experiment genomen.

- *Bovendien wordt u verzocht te beschrijven of de dieren volledig hersteld zijn van de operatie voordat de waterfles weggenomen wordt.*

Reactie opmerking 3: de waterrestrictie wordt 10 dagen na de operatie ingezet nadat vastgesteld is dat de wond vrijwel volledig hersteld is (dicht en droog). De tweede belangrijke voorwaarde voor het starten van waterrestrictie is dat het lichaamsgewicht constant toename laat zien in de periode na de operatie zoals verwacht mag worden van een gezond dier en een normale groeicurve.

- Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

Reactie opmerking 4: Zie reactie opmerking 2 voor uitgebreide reactie. Samengevat: het verdiende volume water wordt nauwkeurig bijgehouden. Indien een rat op een dag niet voldoende verdient wordt als volgt gehandeld:

1) extra trainingssessie
2) in water gedrenkte voedselpellets
3) eenmalig *ad libitum* water

-De NTS is veel langer dan 500 woorden. U wordt verzocht deze in te korten.

Reactie: de NTS is ingekort.

12.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
[redacted]
van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1120020173084
Bijlagen
1

Datum 25 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 21 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De structuur en functie van corticale netwerken" met aanvraagnummer AVD1120020173084. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 september 2017 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Wij hebben u vragen gesteld over uw onderbouwing van het gebruik van waterdeprivatie en de wijze waarop het welzijn van de dieren tijdens deprivatie geborgd wordt. 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 "De structuur en functie van corticale netwerken" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om

aanvullende informatie gevraagd. Op 21 september 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC gaat in haar reactie in op het gebruik van waterdeprivatie en uw onderbouwing voor het individueel huisvesten van dieren.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Vrije Universiteit Amsterdam
Adres:	de Boelelaan 1105
Postcode en plaats:	1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer:	11200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "De structuur en functie van corticale netwerken" met aanvraagnummer AVD1120020173084, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair Docent.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 augustus 2017, ontvangen op 21 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 september 2017

Datum:
25 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:
[redacted]
Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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

Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Morfologie				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	120	100% Terminaal	
3.4.4.2. Eenvoudig gedrag				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	285	100% Matig	
3.4.4.3. Complex gedrag				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	137	100% Matig	
3.4.4.4. Optogenetische interventie tijdens complex gedrag				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	81	100% Matig	

Voorwaarden

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

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

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

Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

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

Aanvraagnummer:
AVD1120020173084

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.

3104

1.

Centrale Commissie Dierproeven

23 AUG. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? *Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*	☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 11400 ☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: [redacted] KvK-nummer: 64156338
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: de Boelelaan 1117 Postbus: Postcode en plaats: 1081HV Amsterdam IBAN: Tenaamstelling van het rekeningnummer:
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	
1.7	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☒ Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*	
		☐ Nee	

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	01-10-2017
		Einddatum	01-10-2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
		Postadres	[redacted]
		E-mailadres	

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning €1 287 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

Factuuradres: [redacted]

Graag verzoeken we de CCD 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	
Plaats	
Datum	
Handtekening	

2.

Centrale Commissie Dierproeven

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.	11400
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUmc
1.3	Vul de titel van het project in.	Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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

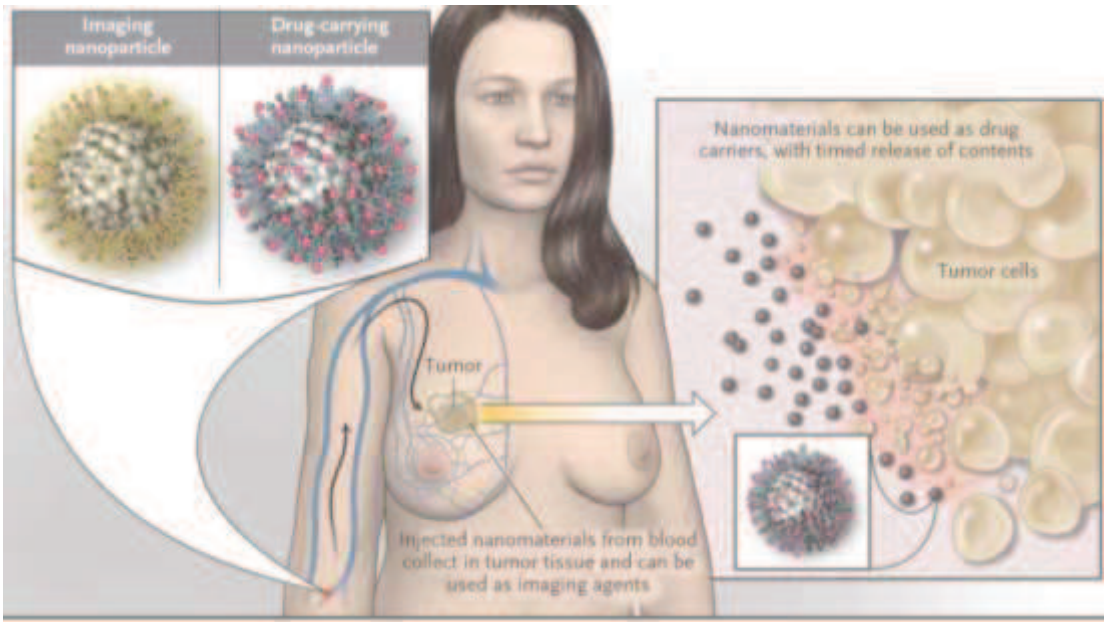
3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Achtergrond nanomedicine
Een van de onderzoeksvelden die binnen het kankeronderzoek veelbelovende resultaten laat zien is het gebruik van nanotechnologie in de geneeskunde, ofwel nanomedicine. Bij nanomedicine wordt gebruikt gemaakt van nanodeeltjes ter grootte van 10 tot 100 nm. Deze nanodeeltjes kunnen worden gevuld met bestaande medicatie en/of contrastmiddelen voor beeldvorming (*zie figuur 1.)* Vervolgens worden deze deeltjes intraveneus ingespoten en komen door het zogenaamde 'enhanced permeability and retention effect' (EPR-effect) bij de tumor terecht. Het EPR-effect ontstaat door de snelle groei van nieuwe bloedvaten in een tumor (ookwel neovasculatuur). Deze bloedvaten zijn slecht ontwikkeld waardoor er lekkende bloedvaten ontstaan. Deze lekkende bloedvaten zorgen ervoor dat nanodeeltjes uit de vaten kunnen treden en zich kunnen ophopen in de tumor en theoretisch minder in de overige delen van het lichaam. Doordat nanodeeltjes zich ophopen in de tumor kunnen ze zeer precies medicatie bezorgen op de plaats van bestemming en dus de zogenaamde 'biodistributie' van medicamenten verbeteren. En omdat in deze deeltjes tegelijkertijd medicatie en contrastmiddel kan zitten is het mogelijk om tegelijkertijd te behandelen en het effect van de behandeling in beeld te brengen. Dit geeft dan de mogelijkheid om minder effectieve behandelingen direct aan te passen.



Figuur 1. Een voorbeeld van het gebruik van nanodeeltjes. Rechtsboven 2 varianten, een nanodeeltje gevuld met contrast voor beeldvorming (links) en een nanodeeltje gevuld met bestaande medicatie (rechts). Belangrijk om te vermelden is dat dit ook tegelijkertijd zou kunnen zodat met een deeltje zowel therapie kan worden gegeven als contrastmiddel voor beeldvorming. Deze deeltjes worden in het vat gespoten en kunnen komen dan bij de tumor terecht middels het hierboven beschreven effect. (illustratie uit Nanomedicine, NEJM 2010)

Helaas is het afgelopen decennium gebleken dat nanomedicine nog niet de ideale therapie is. Nanodeeltjes accumuleren niet alleen in de tumor zoals gehoopt maar ook in andere organen, met name de lever en de milt. Uiteindelijk eindigen naar schatting maar 0,07% van de nanodeeltjes in de tumor. Daarnaast is ontdekt dat een tumor zich uiterst effectief kan verweren tegen deze deeltjes. Zo is er in vele tumoren sprake van heterogene verdeling van de neovasculatuur (de lekkende vaten) wat tegelijkertijd zorgt voor ineffectieve verspreiding van de nanodeeltjes. Vervolgens is er in de tumor sprake van een tumor micro-environment. In dit micro-environment is sprake van een verhoogde druk wat de deeltjes ervan weerhoudt zich vrij te verspreiden door de tumor. En tot slot wordt een overgroot deel van deze deeltjes opgenomen door immuuncellen ondanks vele strategieën om dit tegen te gaan.

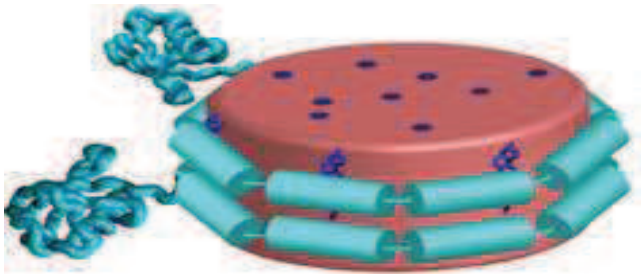
Nano-immunotherapie
De behandeling van kanker is in de afgelopen jaren uitgebreid met de komst van de immunotherapie.

Deze vorm van behandeling maakt gebruik van het eigen immuunsysteem om de tumor aan te vallen. Dit kan door het immuunsysteem extra alert te maken (zoals met cytokine behandeling) of door immuunrespons remmende signalen te blokkeren (zoals met huidige antilichaam behandelingen). Immunotherapie heeft in de kliniek al bewezen effectief te zijn in de behandeling van kanker. Helaas heeft deze nieuwe therapie last van problemen. Bij deze nieuwe middelen is sprake van nieuwe bijwerkingen die zeer ernstig kunnen verlopen. Dit komt onder andere omdat deze medicatie systemisch gegeven wordt en dus door het hele lichaam verspreid wordt. Tot slot is het effect van deze medicatie beperkt tot een kleine groep patiënten en zijn deze middelen erg duur. Ondanks deze nadelen heeft immunotherapie geleid tot een revolutie binnen de kankerbehandeling.

Deze revolutie van de immunotherapie gaf daarnaast aanleiding tot een nieuwe visie in het veld van nanomedicine. Het combineren van immunotherapie en nanomedicine zou ervoor kunnen zorgen dat immunotherapie alleen bij de immuncellen wordt bezorgd. Zoals hierboven beschreven komen nanodeeltjes vaak terecht in de lever en de milt. In deze organen zitten veel immuuncellen. En op deze manier kunnen nanodeeltjes makkelijk worden opgenomen door immuuncellen. Het doel van nano-immunotherapie is om met het gebruik van nanodeeltjes immunotherapie te creëren die medicatie met minder bijwerkingen en hogere effectiviteit.

Het project

In ons project zullen wij gebruik gaan maken van nanodeeltjes die zijn gebaseerd op het menselijke HDL. HDL is beter bekend als het 'goede' cholesterol en komt natuurlijk in mensen voor (*zie figuur 2*). Dit deeltje wordt in het lichaam gevuld met vetten en deze worden op die manier door het lichaam getransporteerd. Het is echter mogelijk om middels bepaalde technieken dit deeltje te vullen met andere stoffen zoals bestaande medicatie. In eerdere onderzoeken door de aanvragers is dit deeltje gebruikt om succesvol medicatie en contrast voor beeldvorming te bezorgen. Er zijn 2 redenen waarom deze deeltjes geschikt zijn voor nano-immunotherapie. Allereerst de grootte van deze deeltjes. Deze deeltjes zijn afhankelijk van de mate van vulling tussen de 20 en 50 nm groot. In het lichaam worden deeltjes van die grootte snel opgenomen door de immuuncellen. Deze eigenschappen gecombineerd maken het HDL-deeltje een geschikt platform om verder aan te passen en te verbeteren.



Figuur 2. Schematische weergave van HDL.

Binnen dit onderzoek willen wij het HDL-deeltje in het laboratorium aanpassen om te controleren of dit effect heeft op zijn functie. Bijvoorbeeld het aanpassen van de grootte, de inhoud en het aanpassen van de buitenkant (shell) van het deeltje. Ten eerste is het effect op de biodistributie van belang en of het mogelijk is om door bepaalde aanpassingen het nanodeeltje te laten accumuleren in bepaalde delen van het lichaam. Ten tweede willen wij kijken of wij de reactie van het immuunsysteem op het deeltje kunnen veranderen. Als kaal HDL wordt opgenomen reageert het immuunsysteem daar minimaal op omdat dit deeltje lichaamseigen is. Wij willen kijken of bij bepaalde manipulaties van het HDL-deeltje het mogelijk is om immuuncellen te leren dat zij tumorcellen moeten aanvallen. Dit willen wij bereiken door bijvoorbeeld immuun stimulerende middelen uit het lichaam na te bootsen met dit deeltje zonder dat het zijn oorspronkelijke werking verliest. Tot slot willen wij de deeltjes die de eerste 2 stappen met succes doorlopen vullen met bestaande medicatie tegen kanker. Het idee is uiteindelijk dat het gemodificeerde deeltje uit het eerste deel van het onderzoek het immuunsysteem klaarmaakt om de tumor te bestrijden en dat de medicatie het immuunsysteem een extra zet kan geven. De nanodeeltjes die wij maken kunnen worden voorzien van radioactieve en/of fluorescente markers om zo beeldvorming van de

deeltjes mogelijk te maken ten tijde van de behandeling.

Door het immuunsysteem op deze manier te activeren zouden er in theorie minder bijwerkingen moeten optreden dan wanneer immunotherapie systemisch wordt gegeven. Dit komt omdat de medicatie in principe alleen op de benodigde plaatsen terecht komt. Verder hopen wij dat het combineren van bestaande medicatie met nanodeeltjes die uit zichzelf een immuunstimulerende werking hebben we een zeer krachtige immuunrespons op gang kunnen brengen. Wij maken in dit onderzoek gebruik van 5 verschillende types kankercellen namelijk: melanoom, longcarcinoom, colon carcinoom, mammacarcinoom, prostaat carcinoom. Deze tumoren hebben alle of een hoge incidente en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. Deze types tumoren worden in de kliniek ook al behandeld met immunotherapie waardoor goed kan worden vergeleken of onze therapie verbetering geeft. Binnen het kankeronderzoek worden veel ontdekkingen gedaan. De aanvragers gebruiken deze types als uitgangspunt, maar wij willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten wij eventueel tumortypes aanpassen of toevoegen. Zowel naar gelang wereldwijd onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten.

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 hoofddoel van dit onderzoek is het ontwikkelen van nieuwe vormen van immunotherapie middels het gebruik van nanodeeltjes. Het is van belang dat deze immuuntherapie voor iedere patiënt effectief is. Deze nieuwe vormen moeten maximale effectiviteit hebben en minimale bijwerkingen.

Om het doel te kunnen bereiken zijn meerdere onderzoeksvragen van belang:
Dierproef 1
1. Wat is de biodistributie van de nanodeeltjes in vivo?
2. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes?

Dierproef 2
3. Wat is de biodistributie en pharmacokinetiek van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie in vivo?
4. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie?

Dit project beslaat een experimenteel onderwerp dat wordt betaald van een speciaal hiervoor behaalde beurs. Eerder onderzoek met andere nanodeeltjes met vergelijkbare deeltjes laten positieve resultaten zien aangaande de specificiteit voor immuuncellen. Voor dit onderzoek zullen wij werken met expertise uit verschillende Nederlandse onderzoeksinstituten en gaan wij een internationale samenwerking aan. De nanodeeltjes die wij gaan testen in vivo zijn vooraf uitgebreid in vitro onderzocht op toxiciteit en wij zullen tijdens de proeven nauwgezet volgen of er onverwachte bijwerkingen optreden. De aanvragers bezitten uitgebreide ervaring en kennis met muizen, tumormodellen en nanodeeltjes. De aanvragers en uitvoerders van het onderzoek hebben allemaal verscheidene publicaties binnen dit onderwerp. In het lab van de aanvragers zijn al eerder succesvolle dierproefaanvragen ingediend en zijn vele dierproeven succesvol uitgevoerd. Uitvoerende personen met minder ervaring (AIO's) zullen goed worden opgeleid door senior werknemers (postdocs, technici, professoren) met meer ervaring voor zij zullen starten met dierproeven. Bij dit onderzoek zijn geen ingewikkelde handelingen gepland, indien de komende jaren nieuwe technieken worden ontdekt zal eerst de benodigde kennis worden opgedaan en zullen de benodigde certificaten worden behaald. Ook zal waar nodig de hulp worden gevraagd van de verzorgenden en technici van het dierproefcentrum. Gezien de uitgebreide ervaring van de aanvragers,

de vergelijkbare proeven in de literatuur en de on-site kennis in het instituut schatten wij de haalbaarheid van dit onderzoek hoog in aangaande het succesvol verlopen van de proeven.

3.3 Belang

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

Het belang van dit werk is het maken van een nieuwe vorm van immunotherapie. Met andere woorden, middelen die uitsluitend een anti-tumor effect vertonen en geen bijwerkingen hebben. De huidige vormen van immunotherapie hebben gezorgd voor een significant betere overleving met minder bijwerkingen dan conventionele therapieën. Het ontwikkelen van nieuwe en innovatieve manieren van immunotherapie die naast minder bijwerkingen ook nog bruikbaar zijn voor alle patiënten is daarom zowel wetenschappelijk als maatschappelijk van groot belang.

Het maatschappelijke belang van dit project is groot. Vooralsnog zijn er bij een groot deel van de kankerpatiënten, zeker in het geval van uitgezaaide kanker, weinig mogelijkheden voor therapie. Het grootste belang is dus dat er uitzicht komt op een nieuwe en betere strategie voor de behandeling van patiënten met uitgezaaide kanker, maar ook dat het effect van de bestaande kanker behandelingen mogelijk beter gevolgd zal kunnen worden. Wanneer dit bereikt wordt zal de kwaliteit van leven van de kankerpatiënt worden verbeterd.

Het wetenschappelijk belang van dit onderzoek indien succesvol is aanzienlijk. De ontdekte nanodeeltjes met goed effect kunnen betrekkelijk makkelijk worden getranslationeerd. Hierdoor zijn klinische trials met deze deeltjes in betrekkelijk korte tijd niet ondenkbaar. Daarnaast zullen enkele nieuwe nanodeeltjes voor het eerst in vivo worden getest en deze zullen ook bruikbaar zijn voor andere onderzoekers. Met name de data over biodistributie van de nanodeeltjes zal van belang zijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene doel van dit project is het ontwikkelen van een nieuwe vorm van immunotherapie met het gebruik van nanodeeltjes. Dit willen wij bereiken door middel van het modificeren van bekende HDL nanodeeltjes, zoals hierboven beschreven. Deze te combineren met een of meerdere vormen van medicatie (cytokines, antigene, antilichamen, chemotherapie, etc.). Deze deeltjes moeten in vivo worden getest op effectiviteit, distributie en toxiciteit. Hierbij is een muistumormodel van belang waarbij wij deeltjes injecteren. Met deze nanodeeltjes kunnen we tegelijkertijd beeldvorming toepassen en therapie geven.

Voor de start van de dierproeven zullen wij in vitro nieuwe deeltjes maken en op onverwachte bijwerkingen (b.v. celschade) en effectiviteit testen. Het doel is om voor de start van de dierproeven een selectie te hebben van ongeveer 20 verschillende nanodeeltjes. Wij zullen ons beperken in dit onderzoek tot 20 deeltjes in verband met de capaciteit. Deze nanodeeltjes zullen van elkaar verschillen in grootte en zullen verschillende aanpassingen in het ApoA1 eiwit bevatten. Dit zal in verschillende mate effect hebben op de biodistributie, het immuunsysteem en de tumor in vivo. Dit wordt onderzocht in dierproef 1. Na de eerste proef zullen deze deeltjes worden gecombineerd met bestaande therapeutische middelen in dierproef 2. Bij het in vivo onderzoek zal worden gelet op de farmacokinetiek en ongewenste bijwerkingen. Deze 2 uitkomstmaten vormen belangrijke indicatoren voor de verdere besluitvorming. Bij een teveel van onverwachte bijwerkingen in vivo of ongunstige biodistributie zal worden besloten het deeltje verder aan te passen of te stoppen met verder onderzoek met dit specifieke nanodeeltje. De mate van besluitvorming zal hieronder verder worden besproken.

Om het doel van dit onderzoek te kunnen bereiken zijn meerdere onderzoeksvragen belangrijk die met twee verschillende dierproeven worden beantwoord:

1. Wat is de biodistributie van de nanodeeltjes in vivo? (Dierproef 1)
Wij gaan een deel van de in vitro geteste nanodeeltjes in vivo controleren op biodistributie en onverwachte bijwerkingen. Hierbij zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente marker. Wij controleren voornamelijk op accumulatie in de milt, tumor, beenmerg, lever en lymfeklieren. Accumulatie in andere organen is minder gewenst maar is geen reden voor een 'no go' besluit.

2. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes? (Dierproef 1)
Verscheidene formulaties van de door ons gemaakte nanodeeltjes zijn erop gericht om uit zichzelf een immuunmodificerend effect te hebben afhankelijk van het soort nanodeeltje (b.v. structuur van oppervlakte [shell]). Deze deeltjes zullen ook worden getest in vitro op onverwachte bijwerkingen en er zal hetzelfde onderzoek mee gedaan worden als hierboven beschreven. Er zal bij deze nanodeeltjes wel meer nadruk liggen op tumorgrootte. Ook zal er nadat de dieren gedood worden verder onderzoek gedaan worden op de verwijderde organen. Wij willen vaststellen of er effect is te zien bij het immuunsysteem van het dier op deze nanodeeltjes.

3. Wat is de biodistributie en pharmacokinetiek van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie in vivo? (Dierproef 2)
Bij proef 2 gaan wij de in proef 1 onderzochte nanodeeltjes combineren met bestaande medicatie (cytokines, antigene, antilichamen, chemotherapie, etc.). Hierbij willen we zien of de nanodeeltjes het (bij)werkingsprofiel van de gebruikte medicatie gunstig beïnvloeden. Wij verwachten dat met name immunomodulerende medicatie die systemisch veel bijwerkingen geven (zoals bijvoorbeeld cytokines en antigeen) verbetering zullen laten zien op het bijwerkingsprofiel. De betere biodistributie zou moeten zorgen voor minder eindorgaanschade van deze middelen. In deze proef zullen we onder andere vergelijken met de lege deeltjes en de 'normale' medicatie die niet in een deeltje zit. Omdat deze proef niet geheel overeenkomt (b.v. door andere volgorde toedienen, dosering, etc.) met die in type dierproef 1 is deze controle noodzakelijk. In deze proef zal voornamelijk controle zijn op biodistributie (van nanodeeltje en medicament) en eventuele onverwachte bijwerkingen.

4. Wat is het immuunmodificerende effect van de nanodeeltjes in combinatie met bestaande medicatie? (Dierproef 2)
De hierboven beschreven proeven geven ons een indicatie welke combinatie van nanodeeltjes en bestaande medicatie het maximale effect geeft. We verwachten een verhoging van de immunomodulerende effecten in vergelijk met de nanodeeltjes zonder bestaande medicatie. Verder krijgen we inzicht in de werking van deze deeltjes zodat ze eventueel verder geoptimaliseerd kunnen worden. Waarbij hierboven meer nadruk ligt op de eventuele bijwerkingen van de nanodeeltjes zal in dit subdoel voornamelijk worden gekeken naar de effectiviteit. Er zal dus gelet worden op tumorgrootte en de eventuele reactie van het immuunsysteem. Deze laatste stap combineert de informatie die is verkregen door de 3 onderzoeksvragen hiervoor en zal voor ieder nanodeeltje worden gebruikt om te kijken of verdere translatie mogelijk is.

Het volledige onderzoek zal bestaan uit 2 onderzoeksonderdelen, die aan elkaar zijn gekoppeld (*zie figuur 3*).

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

Beschrijving dierproef 1
Wij gaan in deze dierproef gebruikmaken van tumor dragende muizen die worden geïnjecteerd met verschillende soorten vormen van nanodeeltjes. Verscheidene formulaties van de door ons gemaakte nanodeeltjes zijn erop gericht om uit zichzelf een immuunmodificerend effect te hebben afhankelijk van het soort nanodeeltje (b.v. structuur van oppervlakte [shell]). De gebruikte nanodeeltjes zijn vooraf in vitro gecontroleerd op toxiciteit. Deze nanodeeltjes worden uitgerust met radioactieve of/en fluorescente marker zodat verscheidene varianten van beeldvorming in dezelfde proef kunnen worden uitgevoerd. De muizen zullen enkele weken worden vervolgd tenzij een humaan eindpunt wordt bereikt. De humane

eindpunten worden gekozen om te voorkomen dat het dier ernstig ongerief zal krijgen. Gedurende deze proef zal worden gelet op onverwachte bijwerkingen die het dier ongerief bezorgen. Uiteindelijk zullen de dieren worden gedood on worden de organen uitgenomen. Zo kunnen wij ex vivo verder onderzoek doen om het effect op de tumor en het immuunsysteem te controleren. Door deze twee punten van beeldvorming (in vivo en ex vivo) kunnen wij op macro en micro niveau zien hoe de biodistributie van de deeltjes is en of zij voldoende worden opgenomen door de immuuncellen. Zo willen vaststellen of er effect is te zien bij het immuunsysteem van het dier door deze nanodeeltjes met een immuunmodificerend effect.

Beschrijving dierproef 2
In deze dierproef worden de gemaakte deeltjes gecombineerd met bekende vormen van medicatie. Uit dierproef 1 hebben wij een uitgebreide bibliotheek aan deeltjes gecreëerd waarvan wij de benodigde kenmerken hebben. Wederom zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente marker zodat wij beeldvorming kunnen uitvoeren en zal aan het einde van de proef zullen de dieren worden gedood en zal verder onderzoek plaatsvinden op orgaan en celniveau. In dierproef 2 is meer nadruk op het effect van de deeltjes op de tumorgroei. Ook in deze dierproef zullen wij enkele nanodeeltjes gebruiken die op zichzelf een immuunmodificerend effect hebben. Wij hopen een synergistisch effect te zien na het toevoegen van medicatie bij deze deeltjes in vergelijk met nanodeeltjes zonder een inherent immuunmodificerend effect. Bij toxiciteit die zorgt voor een humaan eindpunt wordt het dier gedood en verder onderzocht. Bij tumorgroei worden de bekende humane eindpunten voor tumorgroei gebruikt.

Zie 3.4.3 voor een flowchart met de beschrijving van het project

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.

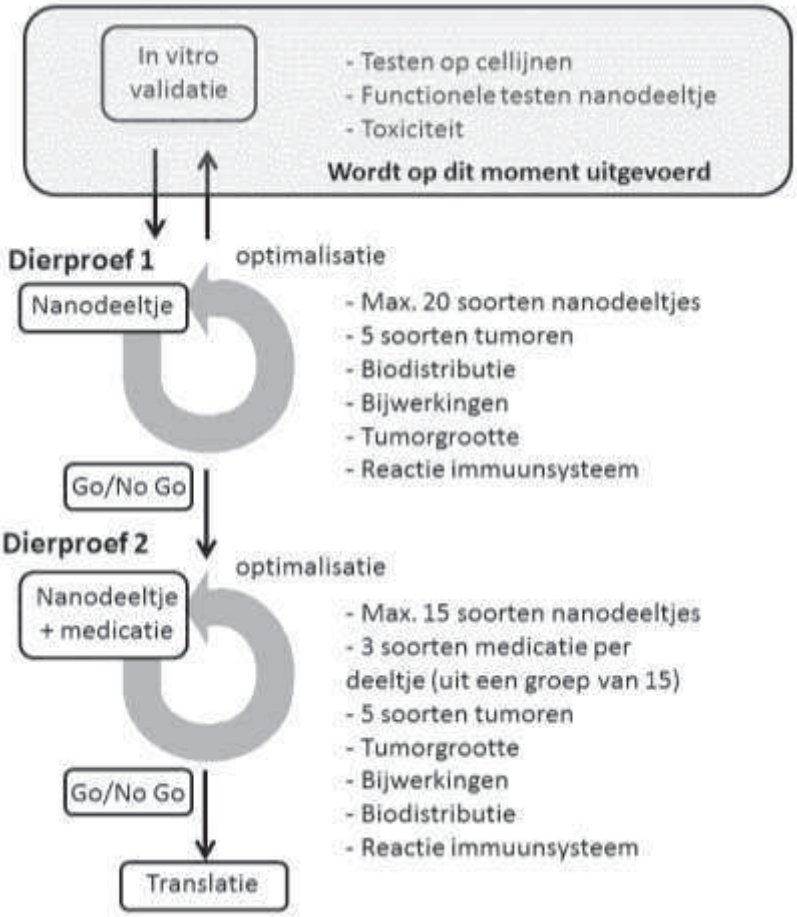
Het doel van dit onderzoek, het creëren van nieuwe vormen van nano-immunotherapie, vraagt een in eerste instantie brede aanpak. Zo zullen wij eerst starten met in vitro onderzoek van een groot aantal nanodeeltjes. In deze fase zal worden gekeken of de gemaakte nanodeeltjes toxisch zijn en of de gemodificeerde deeltjes nog functioneel zijn. Als een van deze 2 uitkomsten ongunstig is dan zal het nanodeeltje niet in vivo worden getest.

Beschrijving dierproef 1
Dierproef 1 is het in vivo controleren van de in vitro geteste deeltjes. Hierbij zal voornamelijk worden gekeken naar het verschil in biodistributie, onverwachte bijwerkingen, de reactie van het immuunsysteem en effect op tumorgroei. Hierbij zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente markers zodat wij beeldvorming kunnen uitvoeren. In dierproef 1 zal bij onverwachte bijwerkingen en ongunstige biodistributie de nodige aanpassingen worden gedaan aan de nanodeeltjes. Bij onverwachte bijwerkingen is het noodzakelijk dat het deeltje aangepast wordt of dat er gestopt wordt met verder onderzoek naar met het specifieke nanodeeltje. Hier is sprake van een go/no go stap. Ongunstige biodistributie wordt in dierproef 1 gezien als het accumuleren van nanodeeltjes in organen anders dan de milt, het beenmerg, de tumor of de lymfeklieren. Ongunstige biodistributie is een minder hard criterium en zal alleen in uitzonderlijke gevallen gebruikt worden als go/no go beslissing. In deze fase van het onderzoek is het namelijk de bedoeling om te onderzoeken waar de nanodeeltjes terecht komen en deze informatie te gebruiken in dierproef 2. Accumulatie van deeltjes in organen (bijv. hersenen, longen, nieren) is daarom niet een reden tot een ‘no go’ besluit aangezien deze informatie kan worden gebruikt om tumoren in deze organen te bereiken. Het volledig ontbreken van accumulatie van deeltjes zal wel worden gebruikt om tot een ‘no go’ beslissing te komen omdat het deeltje dan geen nut zal hebben in dierproef 2. Effect op tumorgroei is wenselijk maar ontbreken hiervan is niet ernstig. Aan het einde van de proef zullen de dieren worden gedood en zal verder onderzoek plaatsvinden op orgaan en celniveau.

Beschrijving dierproef 2
In dierproef 2 van het onderzoek worden de gemaakte deeltjes gecombineerd met bekende vormen van

therapie en/of immunologische medicatie. Deze middelen zullen bestaan uit immunomodulerende medicamenten (checkpoint-inhibitors, antigenen, adjuvant etc.). Uit de dierproef 1 van het onderzoek hebben wij een uitgebreide bibliotheek aan deeltjes gecreëerd waarvan wij de benodigde kenmerken zoals biodistributie hebben onderzocht en gedocumenteerd. Wederom zullen wij de gemaakte deeltjes voorzien van een radioactieve en/of fluorescente marker zodat wij beeldvorming kunnen uitvoeren en zal aan het einde van de proef zullen de dieren worden gedood en zal verder onderzoek plaatsvinden op orgaan en celniveau. In deze dierproef van het onderzoek is meer nadruk op de bijwerkingen van de toegevoegde medicatie en het effect van de deeltjes op de tumorgroei. Bij onverwachte bijwerkingen die dermate ernstig zijn dat zij zorgen voor het bereiken van een humaan eindpunt wordt het dier gedood en verder onderzocht. Bij tumorgroei worden de bekende humane eindpunten voor tumorgroei gebruikt.

Na ieder van deze 2 dierproeven is dus een duidelijk go/no go keuzemoment (*zie figuur 3, stroomdiagram)*. De verwachting is dat van de oorspronkelijke max. 20 nanodeeltjes uit dierproef 1 er max. 15 nanodeeltjes in dierproef 2 worden getest.



Figuur 3: Flowchart van onderzoeksopzet. Bovenaan de in vitro proeven die worden uitgevoerd voor de in vivo proeven. Hierbij zal worden gekeken of de gemaakte nanodeeltjes toxisch zijn en of het eventueel gemodificeerde eiwit zijn natuurlijke werking heeft. Als een van deze 2 uitkomsten ongunstig is dan zal het nanodeeltje niet in vivo worden getest. Hier zal dus ook een Go/No Go beslissing plaatsvinden. Bij proef 1 zullen de in vitro geteste deeltjes in vivo worden getest. Hierbij zal worden gekeken naar onverwachte bijwerkingen en biodistributie. De verwachting is dat wij maximaal 20 soorten deeltjes gaan testen in 5 verschillende tumorvarianten. Er zal ook worden gekeken naar de tumorgrootte en de reactie van het immuunsysteem. De limiterende factor in proef 1 zijn de bijwerkingen. Bij onverwachte bijwerkingen die de muis ongerief bezorgen zal het deeltje weer teruggaan naar de in vitro fase of zal het deeltje niet verder worden gebruikt. Bij proef 2 zal aan het nanodeeltje medicatie worden toegevoegd. Indien alle deeltjes uit proef 1 zonder bijwerkingen zijn zal het mogelijk zijn om ook in proef 2 maximaal 20 nanodeeltjes te onderzoeken. Omdat het uiterst onwaarschijnlijk is dat alle in proef 1 geteste nanodeeltjes geschikt zullen zijn voor verder onderzoek hebben we gekozen om maximaal 15 nanodeeltjes te testen in dierproef 2. Dit zal wederom gebeuren in 5 tumorsoorten. Wij zullen maximaal 15 verschillende varianten van medicatie worden gebruikt. Omdat het testen van alle 15 medicamenten in alle 15 soorten nanodeeltjes zal zorgen voor een te hoog aantal muizen zullen wij gebruik maken van kleine pilotstudies per medicament en zullen niet alle medicamenten in alle nanodeeltjes getest worden. De gebruikte medicamenten worden gekoppeld aan de nanodeeltjes waarvan wij uit proef 1 hebben bevestigd dat zij een gunstige biodistributie hebben voor de medicatie in kwestie. In proef 2 zijn alle 4 genoemde parameters van belang. Indien het deeltje niet

effectief is (tumorgrootte, biodistributie, reactie immuunsysteem) heeft het geen zin om het deeltje te transleren en zal het verder moeten worden ontwikkeld. Indien er sprake is van onverwachte bijwerkingen zal het deeltje ook verder worden geoptimaliseerd of zal worden besloten te stoppen met verder onderzoek van dit deeltje. Alleen bij een bewezen effectief deeltje met minimale bijwerkingen zal kunnen worden overwogen om verder onderzoek te doen met het specifieke deeltje.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes
2	Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes + bestaande medicatie
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.	11400
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUmc
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: Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Wij zullen eerst starten met in vitro onderzoek van een groot aantal nanodeeltjes. Van deze nanodeeltjes zullen enkelen van zichzelf al een immunomodulerend effect hebben op de tumor. In deze fase zal worden gekeken of de gemaakte nanodeeltjes onverwachte bijwerkingen hebben (b.v. celschade) en of de nanodeeltjes nog functioneel zijn. Als een van deze 2 uitkomsten ongunstig is dan zal het nanodeeltje niet in vivo worden getest. De verwachting is dat er van het oorspronkelijke aantal deeltjes er maximaal 20 door gaan voor in vivo testen. Deze verwachting is gebaseerd op ervaring van de aanvragers met eerdere vergelijkbare onderzoeken.

Bij dierproef 1 zal worden gekeken naar onverwachte bijwerkingen en biodistributie. Ook zal er worden gekeken naar de tumorgrootte en de reactie van het immuun systeem. De limiterende factor in proef 1 zijn de bijwerkingen. Bij onverwachte bijwerkingen die de muis ongerief bezorgen zal het deeltje weer teruggaan naar de in vitro fase of zal het deeltje niet verder worden gebruikt.

Wij gaan in deze dierproef gebruikmaken van tumor dragende muizen die worden geïnjecteerd met verschillende soorten nanodeeltjes. *(Zie onderdeel A, tweede onderdeel)* De nanodeeltjes worden intraveneus geïnjecteerd en worden uitgerust met radioactieve en/of fluorescente markers zodat verscheidene varianten van beeldvorming in dezelfde proef kunnen worden uitgevoerd. Deze beeldvorming zal op verscheidene tijdpunten plaatsvinden om zo de biodistributie te kunnen onderzoeken en zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. De muizen zullen enkele weken worden vervolgd tenzij een humaan eindpunt wordt bereikt. Omdat verschillende type tumoren verschillende groei laten zien zal de duur van dierproef 1 per tumorsoort verschillen. De humane eindpunten worden gekozen om te voorkomen dat het dier ernstig ongerief zal krijgen. Gedurende deze proef zal worden gelet op onverwachte bijwerkingen die het dier ongerief bezorgen.

Uiteindelijk zullen de dieren worden gedood en worden de organen uitgenomen. Zo kunnen wij ex vivo verder onderzoek doen om het effect op de tumor en het immuunsysteem te controleren. Door deze twee punten van beeldvorming (in vivo en ex vivo) kunnen wij op macro en micro niveau zien hoe de biodistributie van de deeltjes is en of zij voldoende worden opgenomen door de immuuncellen.

De uitkomstparameters zijn: biodistributie, ongewenste bijwerkingen, immuunrespons, tumorgrootte/tumorgroei. De tumorgroei zal worden vergeleken met een controle groep, die geen behandeling krijgt. Tijdens de proef zullen tumorgroeicurves worden vastgelegd en de dieren regelmatig worden gewogen en op welzijn gecontroleerd. De algehele conditie van de dieren tijdens de proef kan namelijk aanwijzingen geven over de eventuele onverwachte bijwerkingen.

De groepen in een experiment in deze proefopzet zal er als volgt uitzien:

1. Controle groep
2. Controle groep leeg bekend nanodeeltje
3. Nieuw nanodeeltje

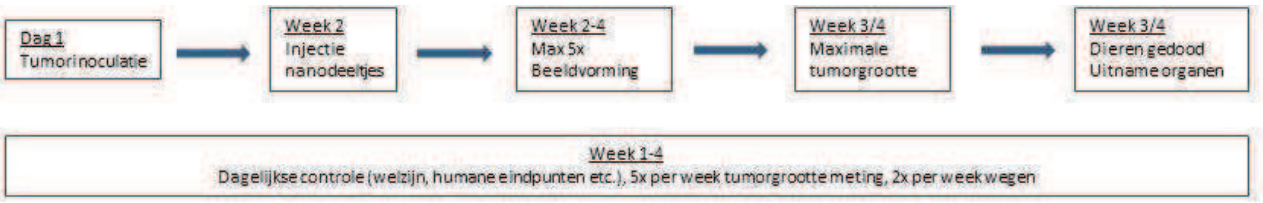
De eerste controle groep zal bestaan uit een groep dieren die injecties zal krijgen met NaCl 0,9% als controle. In dit onderzoek zullen we gebruik maken van een tweede controle groep waarbij we de muizen zullen injecteren met een al uitvoerig getest nanodeeltje. Omdat nanodeeltjes uit zichzelf effect hebben op het immuunsysteem is deze controlegroep van belang om het voordeel te onderzoeken van de door ons gemodificeerde nanodeeltjes. Indien er weinig variatie is in tumorgroei is het niet nodig bij ieder van deze nieuwe nanodeeltjes aparte controle groepen te gebruiken. Daarnaast gaan wij ervan uit dat we per controlegroep meerdere soorten nanodeeltjes kunnen onderzoeken. Echter is niet met zekerheid te zeggen of dit het geval is. Wij gaan hier uit van het maximaal benodigde aantal groepen maar het werkelijke aantal zal hoogstwaarschijnlijk lager zijn.

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.

Volwassen muizen (minimaal 8 weken oud) worden op de flank geïnjecteerd met tumorcellen. (B16-F10 melanoom (C57BL/6)/ TC-1 longcarcinoom (C57BL/6)/CT26 colon carcinoom (BALB/c)/MMTV-PyMT mammacarcinoom (FVB)/TRAMP-C1 prostaat carcinoom (C57BL/6). Deze tumoren hebben alle of een hoge incidente en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. De aanvragers gebruiken deze types als uitgangspunt, maar wij willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten wij eventueel tumortypes aanpassen of toevoegen. Indien wij tumortypes toevoegen zal een wijziging worden aangevraagd bij de CCD aangezien het aantal benodigde dieren dan zal veranderen. Zowel naar gelang wereldwijde onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten.

Wanneer palpabele tumoren gegroeid zijn (20-50 mm^3) worden de muizen geïnjecteerd met nanodeeltjes. De toedieningswijze van de geneesmiddelen is hetzelfde als die bij de mens namelijk intraveneus. Na de injectie met nanodeeltjes worden de zullen de muizen ook maximaal vijf keer beeldvorming onder anesthesie ondergaan om de biodistributie van de nanodeeltjes te volgen in de tijd.

Aangezien enkele van de door ons gemaakte nanodeeltjes van zichzelf effect zullen hebben op de tumorgroei zal tijdens de periode van tumorgroei zullen de muizen 2x per week worden gewogen en zal de tumorgrootte 5x per week worden gemeten met behulp van een schuifmaat. Door in dierproef 1 de tumorgrootte te controleren kunnen wij in dierproef 2 het effect bepalen van de toegevoegde medicatie. De proef zal worden beëindigd en de dieren worden gedood, wanneer de maximaal toegestane tumorgrootte van 2 cm3 is bereikt (dit is ongeveer 3/4 weken na tumorcelinjectie). Aangezien wij verschillende tumoren gebruiken tijdens dit onderzoek zal het onderzoek afhankelijk van de groei worden verkort of worden verlengd. Tumoren en organen zullen worden verwijderd voor verder onderzoek.



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

Ook weten we dat er doorgaans een vrij grote variatie in tumorgroei is tussen de dieren en daarom schatten we een groep van 10 dieren als behandelgroep en 10 dieren als controlegroep als realistisch in om een duidelijk effect van de behandeling op de tumorgroei waar te kunnen nemen. Dit kan zoals hierna beschreven statistisch worden onderbouwd met een voorbeeldberekening. Wanneer de aanname wordt gemaakt (volgend uit eerdere experimenten) dat eventuele behandeling 70% effectief is (uitkomstmaat tumorgroei), is de berekening als volgt:

π (behandel groep)=0.70, π (controle groep)=0, k=10.5 bij 90% power en α=0.05, Δ=0.7, πgemiddeld= (0+0.7)/2=0.35

De volgende formule wordt ingevuld: $n \approx \frac{2 \times \pi gemiddeld \times (1-\pi gemiddeld) \times k}{\Delta 2}$

$\Delta = \pi a - \pi b$

$n \approx \frac{2x0.35x(1-0.35)x10,5}{0.72} = 9.75$ dus 10 dieren per groep

Rekening houdend met uitval van één muis per groep. Komen we uit op 11 dieren per groep.

B. De dieren

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

Muis, geslacht mannelijk/vrouwelijk, immuuncompetente volwassen (minstens 8 weken oud), maximaal 3300 dieren, erkende leverancier

Berekening van het maximaal aantal dieren:
20 soorten nanodeeltjes (schatting van aantal succesvolle deeltjes) x 5 soorten tumoren (om verschillen te controleren per tumor) x 1 toedieningsweg van medicatie (intraveneus) x 3x11 muizen (Interventie + 2x controle groep, zie berekening hierboven) = maximaal 3300 muizen

Bij het uitvoeren van deze proef zullen verscheidene nanodeeltjes worden uitgetest, ieder met unieke eigenschappen. Wij zullen in vitro een grote hoeveelheid deeltjes testen waar naar schatting waarschijnlijk maximaal 20 soorten zullen worden gebruikt in vivo. Daarnaast willen wij indien goeie resultaten worden verkregen uit de eerste ronde de experimenten nogmaals uitvoeren zoals hierboven beschreven.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging
Voor al deze proeven is een intact organisme nodig dat voldoende lijkt op de mens. De basis van deze proef is het ontdekken van de biodistributie van de gemaakte deeltjes. Helaas is er geen adequaat in vitro model

wat hier bij kan helpen. Daarnaast is de reactie van het afweersysteem, de tumorgroei en tumorbloedvatvorming op deze deeltjes zo complex dat het alleen in een diermodel kan worden bestudeerd. Muizen worden daarvoor wereldwijd als voldoende geschikt geacht, en kunnen dus niet vervangen worden door eenvoudigere organismen. Niettemin worden de geschiktheid van de nanodeeltjes pas in muizen getest na een uitgebreide validatie van de targets in in vitro door middel van proeven met cellijnen. Uitsluitend de deeltjes met minimale toxiciteit zullen worden getest in vivo om zo ernstige bijwerkingen bij de dieren te voorkomen.

Vermindering
We zullen de ontwikkelde nanodeeltjes eerst in vitro, door middel van proeven met cellijnen, testen. Een statistische analyse zal ook leiden tot vermindering van proefdieren. Op enkele plaatsen in de projecten zitten go/no-go beslismomenten, waarmee het aantal dieren efficiënt kan worden verminderd. Daarnaast zullen wij indien mogelijk de nanodeeltjes groeperen in proeven zodat minder controlegroepen nodig zijn. Waar mogelijk zullen wij ook controlegroepen hergebruiken om het aantal dieren verder te verminderen. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, en vaak ook dezelfde modellen. Dit heeft als voordeel dat proeven kunnen onderling vergeleken worden en dat deze ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering.

Verfijning
De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. Er is gekozen voor de muis, omdat dit wereldwijd een goed gevalideerd en erkend proefdiermodel voor kankeronderzoek is gebleken. Deze ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering van proefdiergebruik. Een ander groot voordeel van de muis is dat er voldoende muis specifieke reagentia (bijv. antilichamen) beschikbaar zijn om sluitend onderzoek te kunnen doen.

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

De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn volgens de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek. De dieren zullen worden gescoord op gewicht, uiterlijk (vacht, ogen, neus en ademhalingsfrequentie) en gedrag zoals agressie, isolatie van de groep of verstoppen.

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.

De aanvragers zitten reeds jaren in dit veld van onderzoek en hebben een groot overzicht over de andere onderzoeksgroepen in de wereld die met soortgelijk onderzoek bezig zijn. Omdat het in dit onderzoek gaat om nieuw ontwikkelde nanodeeltjes kan worden uitgesloten dat deze dierproeven al eerder zijn uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

X Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

X Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Tijdens de intraveneuze injectie van de nanodeeltjes, de beeldvorming en bij het doden van de dieren zal adequate anesthesie worden toegepast. Wij verwachten dat geen perioperatieve pijnbestrijding nodig is.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Effect van de behandeling op de organen, algehele malaise, injecties, anesthesie, beeldvorming, tumorgroei

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Aangezien het onbekend is welke biodistributie de nanodeeltjes hebben is het mogelijk dat er sprake zal zijn van therapie op plaatsen die ongewenst zijn. En dan voornamelijk op de lever. Ook zijn bij klassieke medicamenten en immunomodulerende medicatie de daar bijbehorende bijwerkingen te verwachten.

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

De humane eindpunten opgenomen in de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek zullen worden gehanteerd.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tumorgrootte> 2 cm^3, gewichtsverlies >15%, niet eten of normaal drinken, problemen en met de motoriek, gescheurde/ulceratie tumor, ethisch niet aanvaardbare tekenen van pijn criteria gebaseerd op Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek.

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

Minder dan 5%

K. Classificatie van ongerief

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

Procedures	Categorie	Percentage	Duur
1. Verkrijgen muizen, transport	licht	100%	30 min
2. Interventies a. Subcutane injectie tumorcellen b. Staartvene injectie nanodeeltjes/placebo c. Beeldvorming onder anesthesie	 licht licht licht	 100% 100% 100%	 10 min 10 min 20 min
3. Tumorgroei	matig licht	30% 70%	1 week ¾ weken
4. Bijwerkingen nanodeeltjes	licht	100%	½ dagen
4. Doden onder anesthesie	licht	100%	2 min

Cumulatief wordt het ongerief voor 70% van de dieren als licht en voor 30% van de dieren als matig ingeschat. Tumorgroei zonder enkele mate van pijn of ongerief wordt als licht ingeschat. Minimale tekenen van pijn, ongerief of verandering van activiteit zien wij als matig. Ernstig ongerief wordt voorkomen door de gestelde humane eindpunten.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De tumoren en organen van de muizen zullen worden gebruikt voor verdere analyse, daarom is het doden van de dieren essentieel. Ook is het wanneer de maximale tumorgrootte is bereikt niet ethisch om de dieren te laten leven.

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

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

X Ja

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.	11400
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VUmc
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes + medicatie

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In proef 2 zullen wij het effect op tumorgroei en het effect op het immuunsysteem van onze met medicatie gevulde nanodeeltjes (gevuld met cytokines, antigene, antilichamen, chemotherapie, etc.) controleren. Daarnaast zal wederom worden gekeken naar onverwachte bijwerkingen en de biodistributie. Wij gaan in deze dierproef gebruikmaken van tumordragende muizen die worden geïnjecteerd met verschillende soorten vormen van nanodeeltjes. Deze muizen worden op de flank geïnjecteerd met tumorcellen. De proef zal, zoals hierboven besproken, plaatsvinden in verscheidene tumorsoorten met corresponderende diermodellen (B16-F10 melanoom (C57BL/6)/ TC-1 longcarcinoom (C57BL/6)/CT26 colon carcinoom (BALB/c)/MMTV-PyMT mammacarcinoom (FVB)/TRAMP-C1 prostaat carcinoom (C57BL/6)) om zo een duidelijk overzicht te krijgen van het effect van de deeltjes op verschillende tumorsoorten. Deze tumoren hebben alle of een hoge incidente en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. De aanvragers gebruiken deze types als uitgangspunt, maar wij willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten wij eventueel tumortypes aanpassen of toevoegen. Zowel naar gelang wereldwijd onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten.

De nanodeeltjes worden intraveneus geïnjecteerd en worden uitgerust met radioactieve of/en fluorescente marker zodat verscheidene varianten van beeldvorming (bijv. CT, MRI, PET-CT) in dezelfde proef kunnen worden uitgevoerd. Deze beeldvorming, die maximaal vijf keer zal plaatsvinden, zal op verscheidene tijdpunten plaatsvinden om zo de biodistributie en de tumorgroei te kunnen onderzoeken en zal plaatsvinden onder adequate anesthesie. De muizen zullen enkele weken worden vervolgd tenzij een humaan eindpunt wordt bereikt. De humane eindpunten worden gekozen om te voorkomen dat het dier ernstig ongerief zal krijgen. Gedurende deze proef zal worden gelet op onverwachte bijwerkingen die het

dier ongerief bezorgen.

Uiteindelijk zullen de dieren worden gedood on worden de organen uitgenomen. Zo kunnen wij ex vivo verder onderzoek doen om het effect op de tumor en het immuunsysteem te controleren. Door deze twee punten van beeldvorming (in vivo en ex vivo) kunnen wij op macro en micro niveau zien hoe de biodistributie van de deeltjes is en of zij voldoende worden opgenomen door de immuuncellen.

De uitkomstparameters zijn: biodistributie, ongewenste en onverwachte bijwerkingen, immuunrespons, tumorgrootte/tumorgroei. In deze proef zijn verscheidene controle groepen vereist. Om de tumorgroei te vergelijken zal 1 groep geen behandeling krijgen. Daarnaast zal bij 1 groep een nanodeeltje worden geinjecteerd met een voor de aanvragers en in de literatuur bekende biodistributie ter controle. Ook zal ter controle een groep geïnjecteerd worden met alleen de medicatie om zo inzicht te krijgen in het effect van de betere biodistributie van de medicatie op tumorgroei en of de medicatie verpakt in het nanodeeltje een gunstiger bijwerkingsprofiel heeft. Tijdens de proef zullen tumorgroeicurves worden vastgelegd en de dieren regelmatig worden gewogen en op welzijn gecontroleerd.

De groepen in een experiment in deze proefopzet zal er als volgt uitzien:

Pilotstudie dierproef 2:
1. Losse medicatie
2. Medicatie in nanodeeltje dat getest is in dierproef 1

Dierproef 2:
1. Controle groep
2. Controle groep leeg bekend nanodeeltje
3. Controle groep injectie met medicatie
4. Controle groep injectie met medicatie in leeg bekend nanodeeltje (van controle groep 2)
5. Medicatie in nanodeeltje uit proef 1

De eerste controle groep zal bestaan uit een groep dieren die injecties zal krijgen met NaCl 0,9% als controle. In dit onderzoek zullen we gebruik maken van een tweede controle groep waarbij we de muizen zullen injecteren met een al uitvoerig getest nanodeeltje. Wij maken gebruik van pilot studies om de biodistributie te testen zodat hier minder controle groepen nodig zijn. Het hercontroleren van de biodistributie is ook in dierproef 2 noodzakelijk omdat het vullen van het nanodeeltje met medicatie de vorm en grootte kan veranderen en dit in enkele gevallen een effect kan hebben op de biodistributie. De mate van vulling met verschillende medicamenten is vooraf niet te voorspellen en daarom is het noodzakelijk om in dierproef 2 nogmaals de biodistributie te controleren.

Indien er weinig variatie is in tumorgroei is het niet nodig bij ieder van deze nieuwe nanodeeltjes aparte controle groepen nodig. Daarnaast gaan we ervanuit dat wij per controlegroep meerdere soorten nanodeeltjes kunnen onderzoeken. Echter is niet met zekerheid te zeggen of dit het geval is. Tot slot is het mogelijk om controlegroepen uit proef 1 te hergebruiken indien er sprake is van weinig variatie in tumorgroei. Wij gaan hier uit van het maximaal benodigde aantal groepen maar het werkelijke aantal zal hoogstwaarschijnlijk lager zijn.

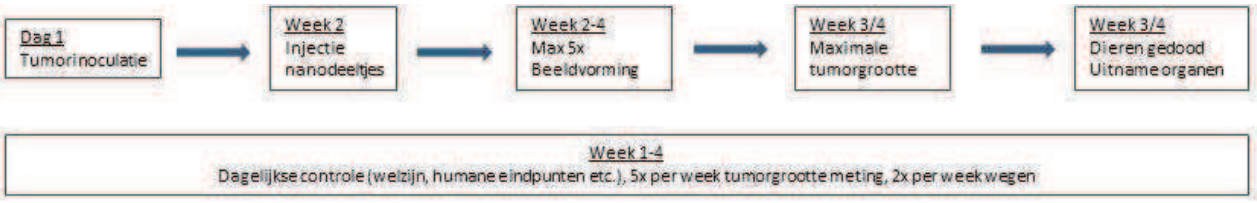
Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Volwassen muizen (minimaal 8 weken oud) worden op de flank geïnjecteerd met tumorcellen. Verschillende diermodellen: (B16-F10 melanoom (C57BL/6)/ TC-1; longcarcinoom (C57BL/6)/CT26; colon carcinoom (BALB/c)/MMTV-PyMT; mammacarcinoom (FVB)/TRAMP-C1; prostaat carcinoom (C57BL/6). Deze tumoren hebben alle of een hoge incidente en/of een hoge mortaliteit. Alle 5 deze type tumoren worden veel gebruikt in kankeronderzoek en hebben alle 5 verschillende kenmerken. Door verschillende types te kiezen kunnen wij onderzoeken of onze behandeling inderdaad een universeel effect heeft zoals verwacht. We gebruiken deze types als uitgangspunt, maar we willen benadrukken dat bij nieuwe resultaten eventueel tumortypes worden aangepast of toegevoegd (zowel naar gelang wereldwijde onderzoeksresultaten als naar eigen onderzoeksresultaten).

Wanneer palpabele tumoren gegroeid zijn (20-50 mm^3) worden de muizen geinjecteerd met nanodeeltjes. In deze proef zullen de nanodeeltjes worden gevuld met medicatie. Naar verwachting gebruiken wij maximaal 15 soorten verschillende medicamenten (cytokines, antigene, antilichamen, chemotherapie, etc.). (zie deel B De toedieningswijze van de geneesmiddelen is hetzelfde als die bij de mens (bijv. intraveneus (in

de bloedbaan), subcutaan (ondehuids), intramusculair (in de spier) of oraal (via de mond)).

De therapie zal doorgang vinden totdat de muizen tumoren van 2000 mm^3 hebben ontwikkeld of tot andere humane eindpunten zijn bereikt. Tijdens de therapie worden de zullen de muizen ook maximaal vijf keer beeldvorming onder anesthesie ondergaan om de biodistributie van de nanodeeltjes en de tumorgroei te controleren en te volgen in de tijd. Tijdens de periode van tumorgroei zullen de muizen 2x per week worden gewogen en zal de tumorgrootte 5x per week worden gemeten met behulp van een schuifmaat. De proef zal worden beëindigd en de dieren worden gedood, wanneer de maximaal toegestane tumorgrootte van 2 cm3 is bereikt (dit is ongeveer 3 weken na tumorcelinjectie). Tumoren en organen zullen worden verwijderd voor verder onderzoek.



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

Ook weten we dat er doorgaans een vrij grote variatie in tumorgroei is tussen de dieren en daarom schatten we een groep van 10 dieren als behandelgroep en 10 dieren als controlegroep als realistisch in om een duidelijk effect van de behandeling op de tumorgroei waar te kunnen nemen. Dit kan zoals hierna beschreven statistisch worden onderbouwd met een voorbeeldberekening.
Wanneer de aanname wordt gemaakt (volgend uit eerdere experimenten) dat eventuele behandeling 70% effectief is (uitkomstmaat tumorgroei), is de berekening als volgt:

π (behandel groep)=0.70, π (controle groep)=0, k=10.5 bij 90% power en α=0.05, Δ=0.7, πgemiddeld= (0+0.7)/2=0.35

De volgende formule wordt ingevuld: $n \approx \frac{2 \times \pi gemiddeld \times (1-\pi gemiddeld) \times k}{\Delta 2}$

$\Delta = \pi a - \pi b$

$n \approx \frac{2 \times 0.35 \times (1-0.35) \times 10,5}{0.72} = 9.75$ dus 10 dieren per groep

Rekening houdend met uitval van een muis per groep. Komen we uit op 11 dieren per groep.

B. De dieren

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

Muis, geslacht mannelijk/vrouwelijk, immuuncompetente volwassen (minstens 8 weken oud), maximaal 5925 dieren, erkende leverancier

Pilot:
15 soorten nanodeeltjes x 3 medicamenten (hierbij gaan wij uit van 15 soorten nanodeeltjes omdat de verwachting is dat niet alle nanodeeltjes succesvol door dierproef 1 komen daarnaast worden de medicamenten gekoppeld aan de nanodeeltjes waarvan wij uit proef 1 hebben bevestigd dat zij een gunstige biodistributie hebben voor de medicatie in kwestie) x 5 soorten tumoren x 2x4 muizen (in deze pilotstudies gaan wij uit van 2 groepen. 1 groep met losse medicatie en 1 groep met medicatie in het geteste nanodeeltje. Zo kunnen wij subdoel 1 van proef 2 namelijk het controleren of er sprake is van betere biodistributie en minder bijwerkingen voldoende controleren) = 1800 muizen

Dierproef 2 onderzoeksvraag 4:
15 soorten combinaties (van nanodeeltjes + medicatie) x 5 soorten tumoren x 5x11 muizen (zie groepen zoals hierboven beschreven) = 4125 muizen

Dit brengt het totaal aantal muizen op 1800 + 4125 = 5925 muizen voor proef 2.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging
Voor al deze proeven is een intact organisme nodig dat voldoende lijkt op de mens. De basis van deze proef is het ontdekken van de biodistributie van de gemaakte deeltjes. Helaas is er geen adequaat in vitro model wat hier bij kan helpen. Daarnaast is de reactie van het afweersysteem, de tumorgroei en tumorbloedvatvorming op deze deeltjes zo complex dat het alleen in een diermodel kan worden bestudeerd. Muizen worden daarvoor wereldwijd als voldoende geschikt geacht, en kunnen dus niet vervangen worden door eenvoudigere organismen. Niettemin worden de geschiktheid van de nanodeeltjes pas in muizen getest na een uitgebreide validatie van de targets in in vitro door middel van proeven met cellijnen. Uitsluitend de deeltjes met minimale toxiciteit zullen worden getest in vivo.

Vermindering
We zullen de ontwikkelde nanodeeltjes eerst in vitro, door middel van proeven met cellijnen, testen. Een statistische analyse zal ook leiden tot vermindering van proefdieren. Op enkele plaatsen in de projecten zitten go/no-go beslismomenten, waarmee het aantal dieren efficiënt kan worden verminderd. Daarnaast zullen wij in proef 2 gebruik maken van pilotstudies om zo een inschatting te kunnen maken nuttige combinaties. Dit zal zorgen voor een grove vermindering van het werkelijk aantal benodigde dieren. Tot slot zullen wij indien mogelijk de nanodeeltjes groeperen in proeven zodat minder controlegroepen nodig zijn. Waar mogelijk zullen wij ook controlegroepen hergebruiken om het aantal dieren verder te verminderen. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, en vaak ook dezelfde modellen. Dit heeft als voordeel dat proeven kunnen onderling vergeleken worden en dat deze ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering.

Verfijning
De noodzakelijke dierproeven zullen uitsluitend uitgevoerd worden in de muis. Er is gekozen voor de muis, omdat dit wereldwijd een goed gevalideerd en erkend proefdiermodel voor kankeronderzoek is gebleken. De ervaring met deze diermodellen (en met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering van proefdiergebruik. Een ander groot voordeel van de muis is dat er voldoende muis specifieke reagentia (bijv. antilichamen) beschikbaar zijn om sluitend onderzoek te kunnen doen.

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

De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn volgens de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek. De dieren zullen worden gescoord op gewicht, uiterlijk (vacht, ogen, neus en ademhalingsfrequentie) en gedrag zoals agressie, isolatie van de groep of verstoppen.

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.

De aanvragers zitten reeds jaren in dit veld van onderzoek en hebben een groot overzicht over de andere onderzoeksgroepen in de wereld die met soortgelijk onderzoek bezig zijn. Daarnaast, aangezien hier het effect van een nieuwe gemaakte nanodeeltjes bestaat kan worden uitgesloten dat deze dierproeven al

eerder zijn uitgevoerd.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

X Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

X Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

X Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Tijdens de intraveneuze injectie van de nanodeeltjes, de beeldvorming en bij het doden van de dieren zal adequate anesthesie worden toegepast. Wij verwachten dat geen perioperatieve pijnbestrijding nodig is.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Effect van de behandeling op de organen, algehele malaise, injecties, anesthesie, beeldvorming, tumorgroei

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Aangezien het onbekend is welke biodistributie de nanodeeltjes hebben is het mogelijk dat er sprake zal zijn van therapie op plaatsen die ongewenst zijn. En dan voornamelijk op de lever. Ook zijn bij klassieke medicamenten en immunomodulerende compounds de daar bijbehorende bijwerkingen te verwachten.

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

De humane eindpunten opgenomen in de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek zullen worden gehanteerd.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

x Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tumorgrootte> 2 cm^3, gewichtsverlies >15%, niet eten of normaal drinken, problemen en met de motoriek, gescheurde/ulceratie tumor, ethisch niet aanvaardbare tekenen van pijn criteria gebaseerd op Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek

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

Minder dan 5%

K. Classificatie van ongerief

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

Procedures	**Categorie**	**Percentage**	**Duur**
1. Verkrijgen muizen, transport	licht	100%	30 min
2. Interventies a. Subcutane injectie tumorcellen b. Staartvene injectie nanodeeltjes/placebo c. Staartvene injectie medicatie d. Beeldvorming onder anesthesie	 licht licht licht licht	 100% 100% 100% 100%	 10 min 10 min 10 min 20 min
3. Mogelijke bijwerkingen van de medicatie	matig	30%	½ dagen
3. Tumorgroei	matig licht	30% 70%	1 week ¾ weken
4. Bijwerkingen nanodeeltjes	matig	30%	½ dagen
4. Doden	licht	100%	2 min

Cumulatief wordt het ongerief voor 70% van de dieren als licht en voor 30% van de dieren als matig ingeschat. De variatie van ongerief bij tumorgroei is een professionele inschatting van de aanvragers gebaseerd op de variatie in tumorgroei (zowel binnen groepen als variatie tussen verschillende tumorsoorten). Tumorgroei zonder enkele mate van pijn of ongerief wordt als licht ingeschat. Minimale tekenen van pijn, ongerief of verandering van activiteit zien wij als matig. Ernstig ongerief wordt voorkomen wij door de gestelde humane eindpunten.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

De tumoren en organen van de muizen zullen worden gebruikt voor verdere analyse, daarom is het doden van de dieren essentieel. Ook is het wanneer de maximale tumorgrootte is bereikt niet ethisch om de dieren te laten leven.

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

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

X Ja

5.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
Het NVWA nummer is 11400

2. Titel van het project:
Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker

3. Titel van de NTS:
Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker

4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon: [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC: *15-06-2017*
   - ☐ aanvraag compleet: *15-06-2017*
   - ☐ in vergadering besproken: *27-06-2017 en 11-07-2017*
   - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t*
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *27-06-2017 tot 30-06-2017 en 14-07-2017 tot 25-07-2017*
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
   - ☐ aanpassing aanvraag: *30-06-2017, 25-07-2017 en 21-08-2017*
   - ☐ advies aan CCD: *21-08-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
-Datum advies IvD: *15-06-2017*
-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: *27-06-2017*
- Strekking gestelde vragen*: Er zijn nog teveel onduidelijkheden, met name m.b.t. de proefopzet en de handelingen aan de dieren dat er besloten is dat de aanvraag op een volgende plenaire DEC vergadering moet terugkomen. De DEC is van mening dat de NTS nog niet voldoende overeenkomst met de inhoud van het projectvoorstel. De achtergrond is erg warrig. Welke processen spelen een rol bij de toepassing van nano-deeltjes? De opzet van de doelen en fasering van het onderzoek is nog*

niet helder/navolgbaar. Onderbouw de keuze voor de controle groepen. Er moet meer uitleg komen bij de 3V's.
- Datum antwoord: *30-06-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *Er is meer uitleg toegevoegd over de deeltjes en het effect daarvan. Opbouw veranderd, meer nadruk op nano-deeltjes. Deel 3.4 in het geheel geherstructureerd. Meer uitleg toegevoegd. Nadruk dat dit het maximaal benodigde aantal dieren is. Verwachting is lager omdat controle groepen kunnen worden hergebruikt en therapiegroepen kunnen worden gegroepeerd. Controle groep 1 is volledig blank, controlegroep 2 is een leeg nano-deeltje wat uit zichzelf al effect kan hebben op het dier, groep 3 is de interventie waarbij we hopen dat het een gewenst effect laat zien. Waar in dierproef 1 de nadruk ligt op biodistributie is bij dierproef 2 voornamelijk de tumorgrootte van belang. Er zal een kleine pilotstudie worden gedaan om zo het effect van verscheidene medicamenten af te kunnen zetten tegen medicatie zonder nano-deeltje. Schema met tijdsbeloop toegevoegd.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. De aangepaste aanvraag zal besproken worden tijdens de eerstvolgende DEC vergadering (11 juli).*

<u>*Vraagronde 2*</u>
- Datum: *14-07-2017*
- Strekking gestelde vragen*: 3.1 De DEC leden zien graag nog dat er nog wordt toegevoegd wat immunotherapie nu precies is? Graag aan 3.4.2 nog uitleg toevoegen over het immuun modificerende effect. De DEC verneemt graag of deze extra tumorsoorten ook onder dit project vallen? De vraag van de DEC is waarom de onderzoekers niet al in dierproef 1 de nano-deeltjes vullen met een oplosmiddel (bv. saline)? omdat dit effect op de biodistributie heeft. Onderdeel K, voeg hier toe: toedienen van medicatie.*
- Datum antwoord: *25-07-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *Uitleg en voorbeelden in tekst gezet. Indien wij tumortypes toevoegen zal een wijziging worden aangevraagd bij de CCD aangezien het aantal benodigde dieren dan zal veranderen. Het controleren van de biodistributie is noodzakelijk omdat een leeg nano-deeltje de vorm heeft van een munt en een gevuld deeltje de vorm heeft van een klein bolletje. Toevoegen van oplosmiddelen is niet mogelijk. Er kunnen alleen vet oplosbare middelen in die allemaal een effect zouden hebben en wij zo onduidelijke resultaten krijgen in deel 1. Medicatie toegevoegd.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

<u>*Vraagronde 3*</u>
- Datum: *21-08-2017*
- Strekking gestelde vragen: *De aantallen in de bijlagen komen niet overeen met de aantallen in de NTS. In bijlage 2 is sprake van 5925 dieren? Dan word het totaal 9925 dieren.*
- Datum antwoord: *21-08-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *De aantallen kwamen inderdaad niet overeen, moet 5925 dieren zijn in bijlage 2, dit is aangepast.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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 doelcategorie translationeel onderzoek is 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.

   Tumoren bestaan naast kankercellen uit allemaal andere soorten van 'zieke' cellen die een tumor helpen groeien. Een deel van deze zieke cellen zijn onze eigen afweercellen, deze voeren niet meer hun normale werk uit maar helpen de kankercellen met groeien. In dit project is het de bedoeling om met behulp van extreem kleine nano-deeltjes deze cellen weer omzetten naar gezonde (anti-kanker) afweercellen. De eigen afweer, het immuunsysteem, wordt zo gebruikt als therapie tegen kankertumoren.

   Het directe doel van dit onderzoek is het ontwikkelen van nieuwe vormen van immuuntherapie middels het gebruik van nano-deeltjes, zogeheten 'Nano-immunotherapie'. Het uiteindelijke doel van de studie is om verscheidene soorten van deze deeltjes te maken en deze te combineren met medicatie, om zo een nieuwe effectievere behandeling tegen kanker te kunnen ontwikkelen. 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

kankerpatiënten. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor de kankerpatiënten bevorderd worden: De kennis opgedaan met dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten.

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 betere behandelingsopties voor kankerpatiënten. 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:

De locatie van de dierproef is binnen de instelling van de vergunninghouder. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De dieren krijgen adequate verdoving.

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.

Het cumulatieve ongerief is voor 30% van de dieren matig en voor 70% van de dieren licht. Het transport, het inspuiten van tumorcellen en nano-deeltjes en/of medicatie, de beeldvorming onder anesthesie en het doden van de dieren veroorzaken licht ongerief. Daarnaast kunnen er mogelijke bijwerkingen optreden bij het gebruik van de nano-deeltjes en/of bij gebruik van de medicatie, dit veroorzaakt licht tot matig ongerief. De tumorgroei zal zorgen voor licht (bij 70%) tot maximaal matig ongerief (bij 30% van de dieren). De variatie van ongerief bij de tumorgroei en de bijbehorende percentages zijn een inschatting van de aanvragers, gebaseerd op vroegere variatie in tumorgroei bij eerdere experimenten.

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 de injecties, tumorgroei en het doden.

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 de humane eindpunten zijn goed gedefinieerd.

De criteria zijn gebaseerd op de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek: Tumorgrootte> 2 cm^3, gewichtsverlies >15%, niet eten of normaal drinken, problemen en met de motoriek, gescheurde/ulceratie tumor of ethisch niet aanvaardbare tekenen van pijn criteria. Gebaseerd op eerdere experimenten verwacht men dat minder dan 5% van de dieren het humane eindpunt bereikt.

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.

Om te kunnen zien of de nieuwe nano-immunotherapie werkt is een intact organisme nodig dat voldoende lijkt op de mens. Om te kijken of de nano-deeltjes wel op de goede plek aankomen (biodistributie), het gewenste effect hebben en of er geen bijwerkingen optreden, is het noodzakelijk proefdieren te gebruiken. Dit is helaas niet mogelijk in celkweek. De geschiktheid van de nano-deeltjes zal echter pas in muizen getest worden na een uitgebreide validatie van de targets in celkweekexperimenten. Daarnaast is de reactie van het afweersysteem, de tumorgroei en tumorbloedvatvorming zo complex dat het op dit moment alleen in een diermodel kan worden bestudeerd.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Er is gekozen voor de muis, omdat dit wereldwijd een goed gevalideerd en erkend proefdiermodel voor kankeronderzoek is gebleken. Een ander groot voordeel van de muis is dat er voldoende muis specifieke reagentia (bijv. antilichamen) beschikbaar zijn om aansluitend onderzoek te kunnen

doen. Ook hebben de aanvragers veel ervaring met muisexperimenten, zodat de kans op het herhalen van experimenten minimaal is.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe.

    In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

    Door het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een statistische analyse wordt voorkomen dat er teveel (of te weinig) dieren worden gebruikt. Indien mogelijk zullen de nano-deeltjes worden gegroepeerd, zodat minder controlegroepen en dus minder dieren nodig zijn. Wereldwijd wordt de muis gebruikt voor kankeronderzoek, en vaak ook dezelfde modellen. Dit heeft als voordeel dat proeven onderling vergeleken kunnen worden en dat de ervaring (met bijvoorbeeld doseringen) kan leiden tot vermindering.

    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 9225 muizen 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 zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn volgens de Code of practice voor dierproeven in het kankeronderzoek. De dieren zullen worden gescoord op gewicht, uiterlijk en gedrag en indien nodig worden de humane eindpunten toegepast.

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.

    Tijdens de experimenten zal men gebruik maken van zowel mannelijke als vrouwelijke muizen.

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.

De experimenten kunnen niet uitgevoerd worden zonder dat de dieren gedood worden, de tumoren en organen van de muizen zullen worden gebruikt voor verdere analyse. 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?

Rechtvaardigt het ontwikkelen van een nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker het gebruik van maximaal 9225 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 matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: Voordeel vanwege de kennisontwikkeling over de nano-immunotherapie. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: veel voordeel wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van betere behandelopties voor kankerpatiënten.

De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 9225 muizen, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van meer kennis over de nano-immunotherapie 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 ontwikkelen van nieuwe vormen van immuuntherapie

middels het gebruik van nano-deeltjes, om zo een nieuwe effectievere behandeling tegen kanker te kunnen ontwikkelen. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten dankzij nano-immunotherapie, 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 9225 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) Het maatschappelijk belang is substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen naar verwachting bijdragen aan het beschikbaar komen van betere behandelingsopties voor kankerpatiënten.

(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 belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 9225 muizen en het daarbij verwachte lichte tot 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.

6.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
[redacted]
van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020173104

Bijlagen
2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 augustus 2017. Het gaat om uw project "Nano-immunotheraPie voor de behandeling van kanker". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020173104. 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:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

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:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11400
Naam instelling of organisatie:	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	64156338
Straat en huisnummer:	de Boelelaan 1117
Postcode en plaats:	I181 HV AMSTERDAM

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

Gegevens gemachtigde

BSN:	[redacted]
Naam:	[redacted]
Adres:	van der Boechhorststraat 1
Postcode en plaats:	1081 BT AMSTERDAM
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 oktober 2017
Geplande einddatum:	1 oktober 2022
Titel project:	Nano-immunotheraPie voor de behandeling van kanker
Titel niet-technische samenvatting:	Nano-immunotheraPie voor de behandeling van kanker
Naam DEC:	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC:	[redacted]
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Amsterdam
Datum:	21 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
[redacted]
van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020173104

Bijlagen
2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 22 augustus 2017
Vervaldatum: 21 september 2017
Factuurnummer: 173104

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020173104	€ 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.

7.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
[redacted]
van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020173104
Bijlagen
1

Datum 19 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 21 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker" met aanvraagnummer AVD1140020173104. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

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

U kunt met uw project "Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning 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 Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 21 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
[redacted]
Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
Adres:	de Boelelaan 1117
Postcode en plaats:	I181 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer:	11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Nano-immunotherapie voor de behandeling van kanker" met aanvraagnummer AVD1140020173104, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Promovendus.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 augustus 2017, ontvangen op 21 augustus 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes				
	Muizen (Mus musculus) /	3.300	30% Matig 70% Licht	
3.4.4.2. Tumorgroei model van muis en testen nanodeeltjes + medicatie				
	Muizen (Mus musculus) /	5.925	30% Matig 70% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD1140020173104

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:
AVD1140020173104

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.

3105

1.

Centrale Commissie Dierproeven

23 AUG. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

☒ Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 24400
☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*

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

Naam instelling of organisatie	Genmab
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	30169902

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	Yalelaan	60
Postbus		
Postcode en plaats	3584 CM	Utrecht
IBAN	NL07ABNA0434201234	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	[redacted]	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

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

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 10 - 2017
		Einddatum	1 - 10 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Immunizatie van muizen en ratten voor de productie van antilichamen voor de behandeling van kanker	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	Utrecht
		Postadres	Bureau van de DEC Utrecht [redacted] Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € € 1.287,- 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	15 - 8 - 2017
Handtekening	[redacted]

Genmab

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Genmab B.V.
Yalelaan 60
3584 CM Utrecht
Postbus 85199
3508 AD Utrecht
Tel. +31 (0) 30 2 123 123
Fax +31 (0) 30 2 123 110
www.genmab.com
KvK 30169902

Datum : 22-Aug-2017
Referentie : 2017.II.400.024
Betreft : Project aanvraag 2017.II.400.024

Beste leden van de CCD,

Bij deze wil ik graag een project aanvraag indienen namens de vergunninghouder 24400, getiteld ""Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies".
Deze project aanvraag is reeds doorgesproken met de DEC Utrecht onder nummer 2017.II.400.024.

Toegevoegd vindt u het aanvraag formulier van de project vergunning dierproeven.

Alle andere documenten nodig voor de project aanvraag, zijn reeds digitaal aangeboden worden op de beveiligde mailverbinding.

Met vriendelijke groet,
Animal Welfare Body Genmab

[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'.	24400
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Genmab
1.3	Provide the title of the project.	Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	x Basic research
		x Translational or applied research
		☐ Regulatory use or routine production
		☐ Research into environmental protection in the interest of human or
		☐ Research aimed at preserving the species subjected to procedures
		☐ Higher education or training
		☐ Forensic enquiries
		☐ Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

At our company we concentrate on the generation of new recombinant antibodies, and new innovative antibody formats for the treatment of cancer. For this, we continuously invent and generate new antibodies and test these in pre-clinical and clinical studies.

Cancer is one of the leading causes of death in Western countries including the Netherlands. Many therapies are applied to combat this disease, such as radiation therapy, chemotherapy and immuno-therapy. However, the complexity and heterogeneity of cancer contribute to the fact that not all patients respond to the therapy, or that the cancer returns after a number of years. Although, according to the AACR Cancer progress Report 2016, several new medical products for the treatment of cancer have been approved by the FDA in the last years, it is expected that in the United States in 2016 nearly 600,000 patients will die from some form of cancer (Cancer Statistics 2016, Siegel RL et al, CA Cancer J Clin, 2016). Therefore, development of new and improved antibody formats is a continuing urgent need to further enhance the efficacy of antibody drugs in patients.

At our company we yearly evaluate, in a multidisciplinary team of scientific experts, a large number of novel potential cancer targets that are of interest for antibody targeting therapy. This is done by means of literature search, competitor landscape analysis, collaborations and in vitro studies. Out of these targets only a few targets will be selected to start the generation of antibodies by means of immunization of mice or rats that are able to produce human antibodies.

[redacted]

Fig.1: Antibody selection process.

The experiments that are described in this project application focus on the immunization of mice and rats to generate antibodies. This is the first step in the process of developing and generating new antibodies formats with the final goal of treating cancer in patients.

One of the problems from the early days of immunotherapy was an allergic reaction against the murine antibodies, and thereby hampering the therapeutic function of the antibody. To prevent this, fully human monoclonal antibodies can be used. This can be achieved by making use of mice or rats in which the genes for the production of murine/rat immunoglobulins are silenced and human immunoglobulins gene clusters are introduced which lead to the production of human antibodies in these animals.

We expect to have about 12 -14 targets selected per year for which the immunization procedures described in this application will be initiated.

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 purpose of the experiments described in this application is the generation of a diverse human antibody panel that can be pushed forward in the antibody selection process, that finally will lead to the generation of differentiated antibody therapeutics that are more potent and/or safer than antibodies/drugs currently used in the clinic, and have potential to be "best-in-class" or "first-in-class", as we have done for several antibodies (such as an anti-CD20 antibody (Arzerra®), for the treatment of chronic leucocyte leukemia, and for an anti-CD38 (Darzalex®), for the treatment of multiple myeloma).

3.3 Relevance

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

Antibodies will be developed for the use in the treatment of severe diseases with an unmet medical need, such as cancer.
Research on the efficacy of the antibodies developed at our company can obtain insight in the pathophysiology of the investigated diseases. Furthermore, within this process, scientific relevant findings will be communicated to collaborators and/or published at specific conferences and/or in scientific magazines.

3.4 Research strategy

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

Before the immunization procedures start, an intensive pre-evaluation of novel potential cancer targets that are of interest for antibody targeting therapy are evaluated in a multidisciplinary team of scientific experts. [redacted]

Two animal immunization procedures are described here, one for the protein/cell immunizations and one for the DNA immunizations.

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.

We have the most experience of immunizations with proteins and/or cells. Based on previous studies and a detailed pilot study in our previous work we have selected the most optimal immunization procedure for protein/cell immunization at this moment.

For these immunizations we will use the following immunization protocol:

- [redacted]

These types of experiments are described in “Animal Procedure 1”.

[redacted]

Especially in cases where we have antigen targets, that are difficult to express (e.g. trans membrane spanner proteins), that give very low protein expression levels at in vitro production, or when the antigen needs to consist of a specific conformation epitope, we might enter into some limitations in the traditional protein immunization approach. Therefore, we want to explore the use of DNA immunization in the transgenic mice and rats:

[redacted]

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 success rate of the immunization procedures will be monitored by titer development and diversity of the generated antibody panel. However, it is known that the outcome of this is dependent on the target antigen and can range from no titer development to very high titer development.
Because the titer response is not always correlated with a good success rate on antibody producing B-cells, in both cases (without and with titer development) the lymph nodes and spleen can be collected and used for further processing.

If no titer development is observed, and no antibody producing B-cells are found, it might be considered to perform alternative experiments of immunization with a different type of adjuvant and/or a different source of immunogen. However if this not succeeds as well, no further immunization experiments will be performed using this immunogen.

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	Immunization of mice and rats with protein and cells for the generation of therapeutic antibodies
2	Immunization of mice and rats with DNA for the generation of therapeutic antibodies
3	
4	
5	
6	
7	
8	

9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

3.

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'.	24400
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Genmab
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: Immunization of mice and rats with protein and cells for the generation of therapeutic antibodies

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.

[redacted]

[redacted].

The primary outcome is the titer development. However, since titer development is not always fully predictable for the successful generation of an antibody panel, in some cases the lymph nodes/spleen are collected from mice/rats that do not show a titer development.

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

[redacted]

The general procedure for the immunization protocols described in this animal procedure will be as follows:

- [redacted]

Optionally, at the end of the study a final blood sample can be taken by means of terminal hart puncture under isoflurane anesthesia

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

[redacted]

The two groups can consist of different immunogens (protein, peptides, cells, cell fragments) or different types of adjuvant, with the rational to introduce as much as possible variation in the titer response.

B. The animals

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

[redacted]

Depending on the availability of the different rat/mice strains the immunization experiment will be designed and performed. But in each immunization protocol we will try to include the three different strains since the strains differ slightly in specificity and titer response.

[redacted]
Dawley rats) will be used. This might be applied in cases of practicing purposes (for new techniques) or when no antibodies, or only a minimal variety of antibodies can be produced in the transgenic mice or rats, in order to generate a more potent and diverse panel of antibodies. This will rarely be the case and we expect that only a few studies might be performed with "wild type" animals.

[redacted]

Typically the rats/mice can be used at an age of 2-4 month. This can vary for each experiment and is depending on the availability.

[redacted] When this cannot be applied (p.e. in case of fighting male rats/mice), we consider to house them separately. If so, this will be mentioned in the work protocol and will be discussed with the animal caretakers.

[redacted]

animal procedure	number of immunizatons /year	groep nr	n=/groep	~ nr of animals /experiment	animal needed/year	animals for 5 years
protein immunization protocol	12	2	9	18	216	1080

C. Re-use

Will the animals be re-used?

x No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research

strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement:
Immunization of human immunoglobulin transgenic rats or mice is at this moment the most optimal way to generate and develop antibodies applicable for therapeutic use. Compared to in vitro techniques such as Phage-Display, in vivo immunizations have the big advantage of the natural antibody selection process. This includes positive antibody selection towards the antigen, and a negative antibody selection towards self-antigens. Furthermore, the post ex vivo antibody production process is more guaranteed, because in the animal already a proper antibody production process has been taken place. This reduces the number of production issues dramatically and increases the success rate of generation of a diverse and functional antibody panel with a high binding affinity to the cancer target, which is needed for the development of therapeutic antibodies (https://lifescivc.com/2017/05/human-antibody-discovery-mice-phage).

Reduction:
[redacted]
with the indicated numbers of animals~~;~~, we can indeed expect a diverse panel of (human) antibodies using this method and these rat strains.

Refinement:
We will continuously follow the newest development in transgenic animal strains that can be used for the generation of human antibodies, and search for the most potent model system to generate human
[redacted]

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

We try to keep the time of start immunization until sacrifice for lymph node collection as short as possible. As soon as we detect a positive titer development we will euthanize the animals and collect the spleen and lymph nodes for further processing.
Only in cases where a low titer is detected and no inflammation is visible, the immunization will be continued for another month.
In cases of inflamed and/or swollen skin at the site of injection we will initiate the fusion process as soon as possible. In these cases the frequency of observation will also be intensified.

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.

Each immunization protocol is unique in its combination with immunogen and adjuvant in the transgenic animals.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

x No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

x No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

In some cases we will observe swelling/inflammation as a response to the immunogen/adjuvant combination. But this is a result of an immune response towards the immunogen/adjuvant combination, which we want to achieve in these procedures and it is not preferred to inhibit this.

In cases of observation, the inspection will be intensified, and possible use of analgesia will be discussed with the veterinarian. To keep the time of discomfort as short as possible, initiation of the fusion process and collection of the lymph nodes and spleen will be done as soon as possible.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other adverse effects are expected

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Due to an immune response towards the antigen/adjuvant combination the animals might show some of the following clinical signs:
Swelling at the site of injection, abnormal behaviour, salivation, no response on incentives, apathy,

involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if the humane endpoint is reached.

Indicate the likely incidence.

5% of the animals

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').

0% mild
95% moderate
5% severe

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The lymph nodes and spleen of the animal are needed for the purification of the antibody producing B-cells

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

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

x Yes

DEC UTRECHT

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.II.400.024
2. Titel van het project : Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies
3. Titel van de NTS : Immunisatie van muizen en ratten voor de productie van antilichamen voor de behandeling van kanker

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: 23-06-2017
   - ☐ aanvraag compleet:
   - ☒ in vergadering besproken: 05-07-2017
   - ☐ anderszins behandeld:
   - ☒ termijnonderbreking(en) van / tot : 10-07-2017/09-08-2017
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
   - ☐ aanpassing aanvraag:
   - ☒ advies aan CCD: 14-08-2017

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: 10-07-2017
   - Datum antwoord: 09-08-2017
   - Gestelde vragen en antwoorden:

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U geeft aan dat only in case of poor immune response, footpad injection of antigen with adjuvant wordt gegeven. De DEC vraagt zich af hoe vaak u verwacht dat dit voorkomt. Graag nader toelichten.
  We expect to apply the "footpad" injections in only "2-4%" of all cases described here, what we would regard as really poor antigens. We added a remark on this in the text.
- K. Classificatie van ongerief: Hier dient ook het percentage ernstig ongerief als gevolg van de footpad immunisatie weergegeven te worden.
  In the case of footpad immunization we expect to have severe discomfort in most cases. Since this only will be used in 2-4% of the total animals, we indicate the level of severe discomfort at 5%. Thus, the 5% severe discomfort indicated includes the cases were footpad injection is given as well. The percentage of severe discomfort is somewhat higher because some cases with unexpected discomfort can occur.

Bijlage 2

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Met betrekking tot de [redacted] de DEC zich af of er een verschuiving zal gaan optreden van bijlage 1 naar bijlage 2, binnen de vijf jaar van een eventuele vergunning. Zo ja, dient u hier dan niet vooraf op te anticiperen?
  [redacted].
- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder wat de ratio is voor het toepassen van bioluminescentie of fluorescent imaging. Graag toelichten.
  [redacted]
- De dieren: De ratio voor het gebruik van 3 groepen, waar 2 groepen gebruikt worden in bijlage 1, is niet helder. Graag nog verhelderen.
  [redacted]

the use of n=6 animals per group is enough to get insight in the most optimal techniques/conditions.
In appendix I we already tested several techniques in previous studies and there we already selected two most optimal conditions to finally generate a diverse antibody panel. In these kind of immunization studies we consider n= 9 animals per group as sufficient to generate a diverse antibody panel.
[redacted]

Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: U heeft het hier over het isoleren van B-cellen. Dit is te ingewikkeld voor een leek en dient versimpeld te worden.
  We have adjusted this to "Zodra de afweerreactie sterk genoeg is, worden de milt en lymfeklieren verzameld waarin de antilichaam producerende afweercellen gelokaliseerd zijn".
- 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: Het aantal dieren lijkt niet te kloppen met het aantal dieren genoemd in de aanvraag. Graag aanpassen.
  The number of animals in the appendix was ok and the number of animals in the NTS is adjusted.

- 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. Een vrij recente en succesvolle therapievorm voor patiënten met kanker is de toepassing van therapeutische antilichamen. Om deze therapievorm te optimaliseren en breder toepasbaar te maken worden nieuwe en gemodificeerde therapeutische antilichamen ontwikkeld. De voorliggende projectaanvraag beschrijft hoe de aanvrager met behulp van immunisatieproeven in muizen en ratten

antilichamen wil genereren, die in een later stadium als input gebruikt kunnen worden voor een hele reeks aan vervolgexperimenten (zowel *in vitro* als *in vivo*) die uiteindelijk leiden tot de ontwikkeling van therapeutische antilichamen. Het belang van de doelstelling is in de ogen van de DEC substantieel. In deze projectaanvraag worden twee verschillende immunisatie-procedures toegepast (bijlagen 1 en 2), omdat het voor het bereiken van de doelstelling van belang is om een grote diversiteit aan antilichamen te kunnen genereren. Daarnaast kan het voor een aantal targets door bepaalde technische aspecten lastig zijn om met behulp van de klassieke immunisatietechniek antilichamen te genereren. DNA-immunisaties kunnen in dergelijke gevallen een uitkomst bieden. De twee procedures worden onafhankelijk van elkaar uitgevoerd. De relatie tussen het hoofddoel en de twee procedures/bijlagen komt daarom 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 doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het genereren van antilichamen door muizen en ratten te immuniseren. Het uiteindelijke doel van het project is de ontwikkeling van nieuwe therapeutische antilichamen voor de behandeling van kankerpatiënten. Het generen van antilichamen is het begin van een reeks (dier)experimentele stappen die nodig zijn voor de ontwikkeling van nieuwe therapeutische antilichamen. De DEC is daarom 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, de doelgroep (kankerpatiënten), het onderzoeksveld en de vergunninghouder. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van een doeltreffende therapeutische behandeling). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de vergunninghouder worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke en commerciële ontwikkelingen).

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 onderzoeksgroep

heeft veel ervaring met de ontwikkeling van therapeutische antilichamen en de uitvoering van het dierexperimenteel onderzoek dat daar een belangrijk onderdeel van is. De onderzoeksgroep heeft in het verleden laten zien dat preklinische studies, zoals beschreven in de voorliggende projectaanvraag, eraan bijdragen dat nieuwe therapeutische antilichamen succesvol naar de kliniek gebracht kunnen worden. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten, wat onder andere blijkt uit de toepassing van de relatief nieuwe DNA-immunisatietechniek en het gebruik van recent ontwikkelde gehumaniseerde ratten- en muizenstammen (OmniRats en OmniMice). Daarnaast is de DEC van mening dat het projectvoorstel geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken.

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. [redacted], omdat uit voorgaand onderzoek gebleken is dat via deze route met zo min mogelijk ongerief voor de dieren een optimale opbrengst van antilichamen gerealiseerd kan worden. Mocht blijken dat de opbrengst onvoldoende is, dan zal men uitwijken naar injectie van de betreffende immunogeen/adjuvans combinatie in de voetzool (naar schatting in 2-4% van de gevallen). Deze administratieroute heeft in het verleden zeer goede resultaten opgeleverd, maar gaat gepaard met ernstig ongerief voor de dieren, en wordt daarom alleen als back-up gebruikt wanneer de doelstelling van het project voor het betreffende immunogeen niet op een andere wijze behaald kan worden. [redacted] afgenomen om antilichaamtiters te bepalen. Wanneer antilichaamtiters voldoende hoog zijn worden de betreffende dieren geëuthanaseerd en [redacted]. De duur van een experiment hangt af van de snelheid waarmee voldoende hoge antilichaamtiters bereikt worden, met een maximum van 4 maanden. Wanneer blijkt dat een bepaalde immunogeen/adjuvans combinatie onvoldoende hoge antilichaamtiters oplevert, dan kan het betreffende experiment herhaald worden met een ander adjuvans en/of een andere bron van hetzelfde immunogeen. Wanneer dit ook te lage antilichaamtiters oplevert, dan wordt dit beschouwd als een no-go, en worden geen andere experimenten met het betreffende immunogeen uitgevoerd.

Welzijn dieren

9. Er is 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)
   De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden. Het kan voorkomen dat op de plaats van de injectie van de immunogeen/adjuvans combinatie een zwelling/ontsteking optreedt. Dit is het gevolg van de geïnitieerde immuunreactie die juist het doel is van de voorgenomen experimenten en derhalve niet onderdrukt dient te worden. De dieren waarbij een zwelling/ontsteking waargenomen wordt worden nauwlettend in de gaten gehouden. Indien mogelijk en/of nodig wordt in overleg met de betrokken dierenarts toch pijnstilling toegediend.

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 ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Zowel in bijlage 1 als in bijlage 2 wordt het ongerief voor 95% van de dieren ingeschat als matig, en voor de overige 5% als ernstig. Dit ongerief is het gevolg van de immuunreactie die optreedt na injectie van een immunogeen/adjuvans combinatie. De immuunreactie kan gepaard gaan met zwelling/ontsteking op de injectieplaats (zie ook C9), maar in ernstigere gevallen ook met symptomen als afwijkend gedrag, speekselen, apathie, tremoren, convulsies en/of diarree. Er is ook sprake van ernstig ongerief als gebruik gemaakt moet worden van immunisatie in de voetzool (zie ook C8).

12. Naar de mening van de DEC wordt de integriteit van de dieren door de voorgenomen experimenten niet aangetast.

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. Men houdt er rekening mee dat bij 5% van de dieren een hevige immuunreactie kan optreden na injectie van een immunogeen/adjuvans combinatie (zie ook C11). Dieren worden vroegtijdig geëuthanaseerd zodra symptomen waargenomen worden die duiden op ernstig ongerief.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Immunisatie van transgene ratten en muizen is de meest optimale manier om antilichamen voor therapeutische doeleinden te genereren. Deze klassieke techniek heeft in vergelijking met proefdiervrije technieken, zoals de de zogenaamde 'human antibody phage display' techniek, het grote voordeel dat sprake is van een natuurlijk proces van antilichaamselectie. Dit proces levert hoog affine antilichamen op die gericht zijn tegen lichaamseigen/humane antigenen. Dit in tegenstelling tot *in vitro* technieken: deze leveren ook antilichamen op die gericht zijn tegen lichaamsvreemde/niet-humane antigenen. Daarnaast moeten geselecteerde antilichamen naderhand een complex *in vitro* proces van affiniteitsmaturatie ondergaan voordat zij de gewenste eigenschappen van specifiek-functionele antilichamen bezitten.

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. Door jarenlange ervaring weet de onderzoeksgroep hoeveel dieren per stam en conditie nodig zijn om een breed scala aan antilichamen te produceren. De aanvrager heeft in beide bijlagen met behulp van een tabel helder uiteengezet hoe het benodigde aantal dieren is berekend.

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 onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de uit te voeren experimentele handelingen. De dieren worden nauwlettend geobserveerd, zodat tijdig geconstateerd wordt wanneer een dier het humaan eindpunt bereikt, en ernstig ongerief tot een minimum beperkt kan worden. Met behulp van eerder uitgevoerde dierexperimenten heeft de onderzoeksgroep (op verzoek van de DEC) uitvoerig onderzocht welke immunisatieroute optimaal is in termen van dierenwelzijn en antilichaamtiters. Deze opgedane kennis is geïmplementeerd in de voorliggende projectaanvraag.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstelling van het project alleen behaald kan worden wanneer de antilichaamproducerende B-cellen *post mortem* uit de lymfeknopen en de milt geïsoleerd kunnen worden. De dieren worden volgens een passende – en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde – 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: rechtvaardigt het belang van het voorliggende project, dat tot doel heeft met immunisatieproeven in muizen en ratten nieuwe antilichamen te genereren en daarmee bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische antilichamen voor de behandeling van kankerpatiënten, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn van de gebruikte proefdieren?

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van het welzijn van de proefdieren plaats, welke gepaard gaat met matig tot ernstig ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project eraan bijdragen dat nieuwe en effectievere therapeutische antilichamen beschikbaar komen voor kankerpatiënten. Patiënten zouden daar zeer bij gebaat zijn, omdat de huidige therapieën vaak onvoldoende effectief zijn en gepaard gaan met vervelende bijverschijnselen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. De onderzoeksgroep heeft in het verleden laten zien dat preklinische studies, zoals beschreven in de voorliggende projectaanvraag, eraan bijdragen dat nieuwe therapeutische antilichamen succesvol naar de kliniek gebracht kunnen 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. Daarbij wordt opgedane kennis uit voorgaand onderzoek ter verfijning van de beschreven dierexperimenten optimaal toegepast.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het genereren van nieuwe antilichamen met behulp van immunisatieproeven in muizen en ratten een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn 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.

5.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Genmab B.V.
[redacted]
Yalelaan 60
3508 AD 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
AVD2440020173105
Bijlagen
2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted] [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 augustus 2017. Het gaat om uw project "Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD2440020173105. 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:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020173105

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:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020173105

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	24400
Naam instelling of organisatie:	Genmab B.V.
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	30169902
Straat en huisnummer:	Yalelaan 60
Postcode en plaats:	3584 CM UTRECHT
IBAN:	NL07ABNA0434201234
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	[redacted]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
22 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD2440020173105

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer:	30169901
Naam:	[redacted]
Adres:	Yalelaan 60
Postcode en plaats:	3508 AD UTRECHT
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?	Ja
Wat mag de gemachtigde doen?	[ ] Een projectvergunning aanvragen [ ] Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen [ ] Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning [ ] Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift [x] Alle bovenstaande opties

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:	Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies
Titel niet-technische samenvatting:	Immunizatie van muizen en ratten voor de productie van antilichamen voor de behandeling van kanker
Naam DEC:	Utrecht
Postadres DEC:	Bureau van de DEC Utrecht , [redacted] , Postbus 85500, 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC:	dec-utrecht@urncutrecht.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] Melding Machtiging [x] DEC-advies

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Utrecht
Datum:	15 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Genmab B.V.
[redacted]
Yalelaan 60
3508 AD 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
AVD2440020173105

Bijlagen
2

Datum 22 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 22 augustus 2017
Vervaldatum: 21 september 2017
Factuurnummer: 173105

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD2440020173105	€ 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.

6.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Genmab B.V.
[redacted]
Yalelaan 60
3508 AD UTRECHT

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD2440020173105

Datum 29 augustus 2017
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 22 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies" met aanvraagnummer AVD2440020173105. Uw aanvraag is helaas niet compleet. 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 te kunnen beoordelen:

Bijlagen
In het Projectvoorstel geeft u aan dat er twee Bijlagen Dierproeven zijn. Bijlage Dierproeven 3.4.4.2 heeft u echter niet meegestuurd met de aanvraag. Graag ontvangen wij deze bijlage.

Leges
De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Opsturen binnen veertien dagen
Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hiervoor het formulier dat u bij deze brief krijgt. Wanneer wij de aanvullende informatie niet binnen de gestelde termijn hebben ontvangen, kunnen wij uw aanvraag buiten behandeling stellen.

Wanneer een beslissing
De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

Datum
29 augustus 2017

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD2440020173105

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.

Bijlage:
- formulier Melding Bijlagen via de post

Centrale Commissie Dierproeven

Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager			
Postcode		Huisnummer	

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.

Aanvraagnummer	

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

- ☐
- ☐
- ☐

3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam	
Datum	- - 20
Handtekening	

Centrale Commissie Dierproeven

7.

Appendix
Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'.	24400
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Genmab
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: 2 Type of animal procedure: [redacted]

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.

[redacted]

The primary outcome is the titer development. However, since titer development is not always fully predictable for the successful generation of an antibody panel, in some cases the lymph nodes/spleen will be collected from mice/rats even without titer development.

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

[redacted]:

- Each individual animal experiment will be discussed, designed and described by a team of experts and will be supported with a rational, study design, group sizes, protocol, and animal welfare expectations.
- All designed animal experiments will be in line with the Code of Practice "Code of for immunization of laboratory animals", and working party on immunization procedures (Keuringsdienst van Waren; *Inspectorate for Health Protection and Veterinary Public Health)*, amended second version August 2000 or revised versions
- Approval of each animal experiment needs to be requested and approved by the AWB and compliance from the animal facility.

[redacted]

In some studies bioluminescence of fluorescent imaging will be applied when luciferase or fluorescent protein containing DNA constructs are used. In these cases anesthesia by means of isoflurane inhalation is applied for each measurement. Measurements can be done once a month, with having 4 times as a maximum.

Optionally, at the end of the study a final blood sample can be taken by means of terminal heart puncture under isoflurane anesthesia

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

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

The exploratory studies will also be applied for different cancer targets and if successful, the obtained antibody produced B-cells can contribute to the antibody panel against a specific target.

B. The animals

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

[redacted].

Depending on the availability of the different rat/mice strains the immunization experiment will be designed and performed. But in each immunization protocol we will try to include the three different strains since the strains differ slightly in specificity and titer response.

In some cases we might consider the use of alternative strains such as the HuMab mice, or other newly developed transgenic mice. In some minor cases wild type mice or rats (such as BALB/c mice or sprague dawley rats) will be used. This might applied in cases of practicing purposes (for new techniques) or when no antibodies or only a minimal variety of antibodies can be produced in the transgenic mice or rats, in order to generate a more potent and diverse panel of antibodies. This will rarely be the case and we expect that only a few studies might be performed with “wild type” animals.

[redacted].

Typically the rats/mice can be used at an age of 2-4 months. This can vary for each experiment and is depending on the availability.

Both males and females will be used dependent on the availability and the animals will be housed as much as possible with more rats/mice in 1 cage (2-5 animals/cage). When this cannot be applied (p.e in case of fighting male rats/mice) we consider housing them separately. If so, this will be mentioned in the work protocol and will be discussed with the animal caretakers.

[redacted].

In total, this is [redacted] animals in this animal procedure. We expect the use of [redacted]

mice, which is 216 rats and 144 mice.

animal procedure	number of immunizations /year	groep nr	n=/groep	~ nr of animals /experiment	animal needed/year	animals for 5 years
[redacted]						

C. Re-use

Will the animals be re-used?

x No, continue with question D.

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

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

☐ No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:
At this moment, the most effective procedure to generate antibodies for future therapeutic use is via the immunization of human immunoglobulin transgenic rats or mice. In contrast to in vitro techniques such as Phage-Display, in vivo immunizations make optimal use of the natural antibody selection process. This includes positive selection and clonal expansion of B cells expressing antibodies towards the antigen of interest, and a negative selection (deletion) of those B cells that express antibodies that react with self-antigens. Furthermore, the post ex vivo antibody production process is better guaranteed. In the animal the selection for proper antibody expression has already taken place, which dramatically reduces the number of manufacturing issues.
Overall, the use and immunization of human immunoglobulin transgenic animals increases the success rate for the generation of diverse panels of antibodies with high binding affinity for the cancer targets, a requirement for the development of therapeutic antibodies (https://lifescivc.com/2017/05/human-antibody-discovery-mice-phage).

Reduction:
[redacted].

Refinement:
We will continuously follow the newest development in transgenic animal strains that can be used for the generation of human antibodies, and continuously will search for the most potent model system to generate human antibodies in collaboration with external partners. [redacted]

[redacted]

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

We try to keep the time of start immunization until sacrifice for lymph node collection as short as possible.
As soon as we detect a positive titer development we will euthanize the animals and collect the spleen and lymph nodes for further processing.
Only in cases where a low titer is detected and no inflammation is visible, the immunization will be continued for another month.
In cases of inflamed and/or swollen skin at the site of injection we will initiate the fusion process as soon as possible. In these cases the frequency of observation will also be intensified.

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.

Each immunization protocol is unique in its combination with immunogen and adjuvant in the transgenic animals.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

x No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

x No > Continue with question H.

☐ Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

☐ No > Continue with question I.

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

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

In some cases we might observe swelling/inflammation as a response to the immunogen/adjuvant combination. But this is a result of an immune response towards the immunogen/adjuvant combination, which we want to achieve in these procedures and it is not preferred to inhibit this.

In case of observation swelling/inflammation the inspections will be intensified, and possible use of analgesia will be discussed with the veterinarian. To keep the time of discomfort as short as possible, initiation of the process to euthanize the animals and excise the lymph nodes and spleen will be done in a reasonable time.

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

In experiments where the "Gene gun" method is used, anesthesia by means of inhalation is applied

In experiments were bioluminescent or fluorescence imaging is applied, anesthesia by means of inhalation will be used

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

No other adverse effects are expected

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

☐ No > Continue with question K.

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

Due to an immune response towards the antigen/adjuvant combination the animals might show the following clinical signs:
Swelling at the site of injection, abnormal behaviour, salivation, no response on incentives, apathy, involuntary shaking of the body or limbs (tremor), convulsion (where the body muscles contract and relax rapidly and repeatedly), self-mutilation, piloerection, abnormal non-physiological posture, diarrhea. The level of severeness of these clinical signs can be used to determine if the humane endpoint is reached.

Indicate the likely incidence.

5% of the animals

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').

0% mild
95% moderate
5% severe

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

☐ No

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

The lymph nodes and spleen of the animal are needed for the purification of the antibody producing B-cells

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

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

x

☐ Yes

8.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Genmab B.V.
[redacted]
Yalelaan 60
3508 AD 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
AVD2440020173105
Bijlagen
1

Datum 18 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 22 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies" met aanvraagnummer AVD2440020173105. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het insturen van de ontbrekende Bijlage Dierproeven 3.4.4.2.

Beslissing
Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.
De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

U kunt met uw project "Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

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.
Er is sprake van ernstig ongerief.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

Algemeen Secretaris

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

Centrale Commissie Dierproeven

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:	Genmab B.V.
Adres:	Yalelaan 60
Postcode en plaats:	3584 CM UTRECHT
Deelnemersnummer:	24400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Immunization of mice and rats for the generation of therapeutic antibodies" met aanvraagnummer AVD2440020173105, volgens advies van Dierexperimentencommissie 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 22 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 22 augustus 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 augustus 2017, ontvangen op 22 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 augustus 2017

Aanvraagnummer:
AVD2440020173105

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Immunization of mice and rats with protein and cells for the generation of therapeutic antibodies				
	Muizen (Mus musculus) /	432	5% Ernstig 95% Matig	
	Ratten (Rattus norvegicus) /	648	5% Ernstig 95% Matig	
3.4.4.2 Immunization of mice and rats with DNA for the generation of therapeutic antibodies				
	Muizen (Mus musculus) /	144	5% Ernstig 95% Matig	
	Ratten (Rattus norvegicus) /	216	5% Ernstig 95% Matig	

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 maart 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:
AVD2440020173105

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:
AVD2440020173105

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.

3124

29 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*	11200
		☐ Nee > *U kunt geen aanvraag doen*	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
		KvK-nummer	53815211
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	de Boelelaan 1105
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
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	1-1-2018
		Einddatum	31-12-2022
3.2	Wat is de titel van het project?	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
		Postadres	[redacted] Amsterdam | Nederland
		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 *

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

Inkoopordernummer:
Factuuradres:

Graag verzoeken we de CCD om het bovenstaande inkoopordernummer aan de 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	
Plaats	Amsterdam
Datum	23-08-2017
Handtekening	[redacted]

2.

Centrale Commissie Dierproeven

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.	11200
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam
1.3 Vul de titel van het project in.	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

De prefrontale cortex (PFC) in onze hersenen zorgt ervoor dat we onze aandacht kunnen vasthouden en relevante informatie uit onze omgeving kunnen filteren in een doelgerichte manier. Ook reguleert de PFC gedrag en emoties, voornamelijk door het inhiberen van ongepaste emoties, impulsen en gewoontes. Inhibitie van gedrag is beïnvloed in neuropsychiatrische aandoeningen zoals schizofrenie, attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD), verslaving, depressie en autisme. De prevalentie is van deze ziektebeelden is aanzienlijk. Alleen al in Nederland hebben geschat 37.000 mensen schizofrenie, 110.000 mensen ADHD en zijn er nog veel meer mensen met andere PFC-gerelateerde stoornissen (Ministerie van Volksgezondheid, 2011). In patiënten met deze psychiatrische aandoeningen zien we doorgaans ook afwijkingen in PFC activiteit en bijbehorende cognitieve symptomen.

De PFC bestaat uit een uitgebreid netwerk van verschillende soorten neuronen. De outputneuronen van de PFC, de pyramidaalcellen, zijn sterk verbonden met verschillende hersengebieden, bijvoorbeeld het striatum en de thalamus. Ook krijgt de PFC veel input vanuit het brein. Dit kan reciprocale glutamaterge input zijn vanuit bijvoorbeeld de thalamus, of in de vorm van neuromodulators vanuit bijvoorbeeld de basale voorhersenen. Door deze uitgebreide top-down connectiviteit bevindt de PFC zich in de uitstekende positie om gedrag te beïnvloeden. Verschillende onderzoeken hebben met behulp van lesies of farmacologie de rol van de PFC vastgesteld in verschillende cognitieve taken (Passetti et al., 2002). Hoewel waardevol kunnen we met deze methodes geen onderscheid maken tussen specifieke populaties pyramidaalcellen, ingedeeld op basis van hun projectiegebied. De rol van de verschillende soorten neuronen in het focussen van aandacht en het controleren van gedrag is onbekend, maar het begrijpen van deze rol is essentieel om de werking van de gezonde of zieke hersenen te begrijpen.

Zowel de activiteit van de pyramidaalcellen als de mate van aandacht houdt verband met zowel snelle fluctuaties als langzamere veranderingen van de hoeveelheid neurotransmitter acetylcholine in de PFC. Het verlies van acetylcholine functie is geassocieerd met verschillende cognitieve problemen zoals geheugenverlies en aandachtsstoornissen, welke te zien zijn in dementie, de ziekte van Alzheimer's en schizofrenie (Freedman 2014, Sarter et al.). Ondanks de uitgebreide anatomische data over de organisatie van het cholinerge systeem is er weinig bekend over de functionele organisatie. Hoe zowel cholinerge interneuronen in de PFC als cholinerge input neuronen naar de PFC cognitieve processen beïnvloeden is nog onbekend.

Een van de belangrijkste doelen binnen de neurowetenschappen is het begrijpen hoe het gedrag van individuele neuronen leidt tot hogere cognitieve processen zoals aandacht. Recente doorbraken in moleculaire technieken geven onderzoekers nu de mogelijkheid naar specifieke neuronale populaties te kijken door gebruik van virale technieken. Met *Calcium imaging* en elektrofysiologie is het nu mogelijk om nauwkeurig de activiteit van neuronale populaties te volgen tijdens gedrag. Door middel van *optogenetica* en *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADDs)* kunnen we vervolgens die neuronale populaties manipuleren tijdens een complexe gedragstaak.

We willen met dit onderzoeksvoorstel begrijpen hoe de PFC bijdraagt aan aandacht en het onderdrukken van impulsiviteit. Zowel de rol van cholinerge input naar de PFC als de rol van de glutamaterge verbindingen van de PFC worden hierbij bestudeerd in ratten en muizen met behulp van anatomisch, elektrofysiologisch en gedragsonderzoek. De grote overeenkomst in biologische principes tussen ratten, muizen en mensen zorgt ervoor dat de bevindingen gebruikt kunnen worden om de menselijke hersenen in gezondheid en ziekte beter te begrijpen en mogelijk therapieën te ontwikkelen om verslechteringen in aandacht en impulsiviteit te verbeteren.

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?

Dit onderzoek heeft als hoofddoel inzicht te verkrijgen in hoe de PFC betrokken is bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie. Dit zal bereikt worden door het onderzoeken van de rol van verschillende populaties projectieneuronen in gedrag en het bestuderen van neuronen in hersenplakjes. Daarnaast willen we weten hoe dit gedrag en deze populaties beïnvloed worden door acetylcholine. De hypothese is dat verschillende neuronale populaties van de PFC betrokken zijn bij impuls-inhibitie of aandacht, afhankelijk van hun projectiegebied. Tot slot verwachten we een cruciale rol van acetylcholine in het 'voorbereiden' van het neuronale netwerk voor cognitieve belasting. Specifiek hebben we de volgende vragen:

1. Welke neuronale populaties in de PFC zijn betrokken bij aandacht en impuls-inhibitie?
2. Op welke tijdschaal binnen de gedragstaak zijn deze neuronale populaties actief?
3. Welke rol speelt acetylcholine in de PFC in aandacht en impuls-inhibitie?
4. Hoe beïnvloedt acetylcholine neuronale populaties in de PFC?

Voor dit onderzoek is financiering voor de komende vijf jaar. Verder is er binnen de afdeling veel ervaring met deze gedragsexperimenten en zijn alle technieken die hier aangevraagd worden opgezet en lopend. Voor elke stap in het onderzoek is er verder de nodige expertise in huis om dit succesvol uit te voeren, waarvan eerder werk gepubliceerd is in hoog aangeschreven tijdschriften als *Science, Nature Communications* en *eLife.* Er zijn op het lab vier PhD studenten aan het werk op dit project, evenals twee analisten en een post-doctorale onderzoeker. Waar mogelijk zal werk ondersteund worden door stage studenten en andere medewerkers van de afdeling.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang

De PFC is een van de belangrijkste doelgebieden voor onderzoek naar aandacht en impuls-inhibitie door de *top-down* rol die deze speelt bij het moduleren van gedrag. Het voorgestelde onderzoek zal een bijdrage leveren aan de fundamentele kennis over de rol van heterogene celpopulaties in de PFC in cognitie. Dit is een uniek inzicht in een veld waarin vooral onderzoek is verricht naar de PFC als geheel, zonder onderscheid tussen populaties neuronen (subvraag 1). Door het gebruik van methodes als lesie-studies en farmacologie in het verleden is het onmogelijk een inschatting te maken van de tijdschaal waarin neuronale populaties actief zijn binnen gedrag. Met de voorgestelde methodes kunnen we accurate metingen verrichten naar de tijdschalen waarin groepen cellen actief zijn tijdens gedrag (subvraag 2).

De rol van prefrontale acetylcholine in gedrag is door middel van farmacologische studies en genetische deleties vastgesteld in aandacht. Hier willen we graag onderscheid maken tussen de rol van externe cholinerge input naar de PFC en de rol van lokale prefrontale cholinerge interneuronen in cognitie (subvraag 3). De rol van de lokale interneuronen in cognitie is bovendien op dit moment nog niet beschreven in de literatuur. Het voorgestelde onderzoek zou dus een uitstekende kans zijn dit voor het eerst te doen en duidelijkheid te verschaffen over de modulerende invloed van acetylcholine in de PFC tijdens cognitie. Met *in vitro* methodes kunnen we tot slot beschrijven hoe acetylcholine de activiteit van individuele cellen in de PFC beïnvloedt (subvraag 4).

Maatschappelijk belang

Hersenactiviteit in de PFC is aangetast in een breed spectrum van psychiatrische aandoeningen, waaronder schizofrenie, ADHD, de Ziekte van Alzheimer, depressie, angststoornissen en verslaving. De prevalentie van deze aandoeningen is 38%. Dit heeft ernstige gevolgen op zowel persoonlijk vlak maar ook op economie en sociologisch vlak. De World Health Organization (WHO) heeft voorspeld dat onbehandelde psychiatrische aandoeningen 13% uitmaken van de totale globale *burden of disease*. De WHO heeft ook ingeschat dat de verloren economische output door psychiatrische aandoeningen tot 12 biljoen US dollar bedraagt (WHO mental health action plan 2013-2020). Het is daarom cruciaal om een

manier te vinden om PFC activiteit in deze aandoeningen weer te normaliseren. Maar voor we zover zijn, zullen we eerst moeten begrijpen hoe neuronen in de PFC cognitie aansturen in gezondheid.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het project is opgebouwd uit een viertal onderzoeksvragen:

1. Welke neuronale populaties in de PFC zijn betrokken bij aandacht en impuls-inhibitie?

   A. In dit onderzoek is het belangrijk een goed beeld te krijgen van de verbindingen van de PFC met de relevante doelgebieden. Recentelijk zijn er nieuwe virale tracing methodes ontwikkeld die deze neuronale verbindingen preciezer kunnen laten zien. Om een beter beeld te krijgen van de PFC verbindingen willen we beginnen met tracing-experimenten. We willen tijdens de tracing experimenten met virale constructen onderscheid maken tussen projecties van de ventrale mPFC (vmPFC) en dorsale mPFC (dmPFC). In de literatuur is er voor verschillende doelgebieden een differentiële innervatie bekend vanaf de mPFC voor dorsale en ventrale subgebieden (Gabbott et al., 2005). Ook is er op gedrag een onderverdeling bekend tussen dmPFC en vmPFC (Passetti et al., 2002). Daarnaast willen we voor het uitvoeren van gedrag de werking van de beoogde virus constructies vaststellen in hersenplakjes met electrofysiologische methodes.

   B. Als we een goed beeld hebben van de neuronale verbindingen van de PFC willen we gedragsexperimenten uitvoeren in ratten om de rol van deze neuronen in aandacht en impuls-inhibitie vast te stellen. We willen gebruik maken van een nieuwe chemogenetische techniek genaamd *DREADDs (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)*. DREADDs zijn geconstrueerde receptoren die geactiveerd worden door biologisch inerte liganden (Roth, 2016). Deze receptoren kunnen met behulp van virale vectoren specifiek tot expressie worden gebracht in celpopulaties naar keuze. Tijdens een aandachtstaak, kunnen we door het toedienen van een biologische inert ligand populaties manipuleren om effecten op cognitie te testen.

   C. Als we de timing van neuronale activiteit hebben vastgesteld [zie volgende onderzoeksvraag], willen we de noodzaak van deze temporele activatie van deze cellen causaal bewijzen met *optogenetica*. We willen met behulp van virale vectoren lichtgevoelige eiwitten tot expressie brengen in specifieke celpopulaties. De lichtgevoelige eiwitten (opsins) kunnen neuronen activeren of inhiberen op het in punt 2 gevonden tijdsinterval.

2. Op welke tijdschaal binnen de gedragstaak zijn deze neuronale populaties actief?

   We zullen met behulp van de resultaten van subvraag 1 beslissen welke populaties projectieneuronen belangrijk zijn voor aandacht en impuls-inhibitie. Om meer inzicht te krijgen in de temporele betrokkenheid van deze cellen tijdens een gedragstaak stellen we de volgende experimenten voor:

   A. *In vivo neurofysiologie.* Hierbij worden virale vectoren met een *optogenetische* eiwit (*opsin*) geïnjecteerd om specifieke celpopulaties in de PFC van ratten te labelen. Daarnaast worden elektrodes aangebracht in het brein. We kunnen nu met licht deze celpopulaties manipuleren en dus specifiek elektrische signalen oppikken van alleen de gelabelde groep cellen. Op basis van deze zogenaamde '*tagging*' kunnen we vervolgens deze specifieke cellen ook meten tijdens een gedragstaak om zo hun rol tijdens gedrag te ontcijferen.

   B. *In vivo calcium-imaging.* Voor deze techniek worden met behulp van een virale vector *genetically encoded calcium indicators (GECIs)* ingebracht in specifieke celpopulaties in de PFC. Tegelijk implanteren we ook een optische vezel of lens om fluorescente signalen van de calcium indicator te kunnen detecteren. Dit stelt ons in staat om de neuronale activiteit van hele populaties tegelijk te kunnen meten tijdens een gedragstaak.

3. In transgene *Chat-cre* ratten kunnen we selectief met virale vectoren het cholinerge systeem beïnvloeden. We willen zowel cholinerge projecties vanuit het basaal voorbrein naar de PFC als

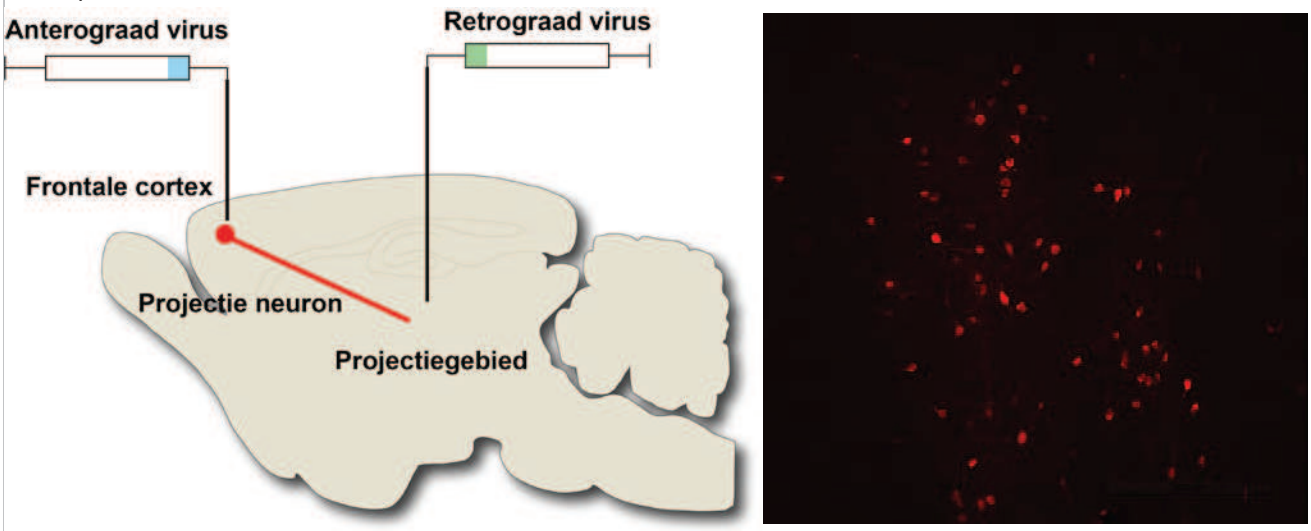
cholinerge interneuronen in de PFC moduleren met DREADDs en de activiteit meten met neurofysiologie en *in vivo calcium imaging*. Tot slot willen we de causale rol van deze temporele activatie benadrukken door controle-experimenten met optogenetica. Alle bovengenoemde methodes zullen gebruikt worden voor het beantwoorden van deze vraag.

4. Hoe beinvloeden inputs naar de mPFC connectiviteit en plasticiteit?
In hersenplakjes zullen we gaan kijken hoe verschillende inputs de plasticiteit en connectiviteit tussen neuronen in de mPFC beïnvloed. Door gebruik van verschillende opsins is het mogelijk inputs te activeren of te remmen. We willen onderzoeken hoe glutamaterge inputs en cholinerge inputs de activiteit in de mPFC beïnvloed.

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

1. Rat anatomische tracing experimenten: ratten ondergaan een operatie met virusinjectie (figuur 1) waarin met behulp van fluorescente eiwitten projectieneuronen of cholinerge interneuronen worden gelabeld.

Rat electrofysiologische experimenten: om virusconstructen die in gedrag worden gebruikt te testen voor goede expressie en functionaliteit ondergaan ratten een operatie met virusinjectie (figuur 1). Zodra het virus tot expressie is gekomen worden neuronen in de hersenplakjes van de ratten gemeten met behulp van elektrodes.



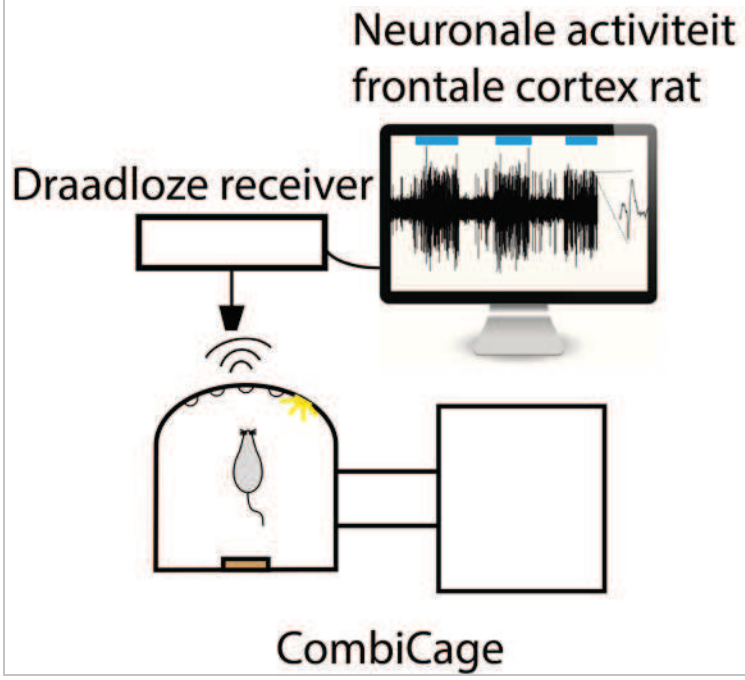
Figuur 1. (links) Voorbeeld injectie protocol waarbij een retrograad virus in een projectiegebied geinjecteerd wordt en een anterograad virus in de frontale cortex waardoor een specifieke groep projectieneuronen gelabeld worden met een opsine of DREADD receptor (rode stippen, rechts).

Rat gedrag: ratten ondergaan een operatie waarbij een DREADD-receptor, opsin of GECI tot expressie gebracht zal worden in de PFC. Na herstel zullen dieren getraind worden in de *5-choice serial reaction time task* (Bari et al., 2008; Remmelink et al., 2017). Ratten worden getraind in operante kooien die aan één wand een magazijn bevatten waarin pellets als beloning gegeven worden (zie figuur 2 voor voorbeeld opstelling). In de andere wand zitten vijf uitsparingen (nose poke holes) met LEDs erin. Ratten worden getraind te reageren op een LED in één van de nose poke holes: Reageert de rat correct dan wordt dit beloond met een pellet. Wanneer de rat geen respons maakt, of een incorrecte of premature respons, dan wordt dit bestraft met een time-out. We gaan ratten trainen op een conventionele manier of in homecage systemen waarbij de ratten zelf bepalen wanneer ze de taak uitvoeren. Wanneer de ratten stabiel zijn in dit gedrag zullen ze getest worden. Voedselrestrictie wordt uitgevoerd om de dieren te motiveren.

DREADDs: ratten die DREADD-receptoren hebben in de PFC zullen getest worden door injecties met biologisch inerte ligands voor de receptoren.

Imaging / neurofysiologie / optogenetica: ratten met een implantaat voor neurofysiologie, optogenetica of imaging zullen getest worden door aansluiting aan een lichtkabel en/of recording systeem.

Muizen elekrofysiologie: Omdat er in muizen veel meer genetische tools beschikbaar zijn, is het mogelijk verschillende celtypen te labelen met fluorescerende markers, of tools aan te brengen die de cel activteit remmen of stimuleren. Met 1-4 elektroden kunnen we de activiteit van neuronen meten in hersenplakjes waarbij we door middel van licht of farmaca de inputs kunnen remmen of stimuleren.



Figuur 2. Schematische weergave van een voorbeeld van een gedragsopstelling waarin de rat getraind en getest wordt (CombiCage). De rat word getraind in een thuiskooi situatie waarbij hij dagelijks automatische getraind wordt in de testkooi. Voor testen wordt hij aangesloten op het calcium imaging of elektrofysiologie systeem en via de computer wordt neuronale en gedragsactiviteit gemeten. Of hij wordt geïnjecteerd met een agonist voor de DREADD receptor.

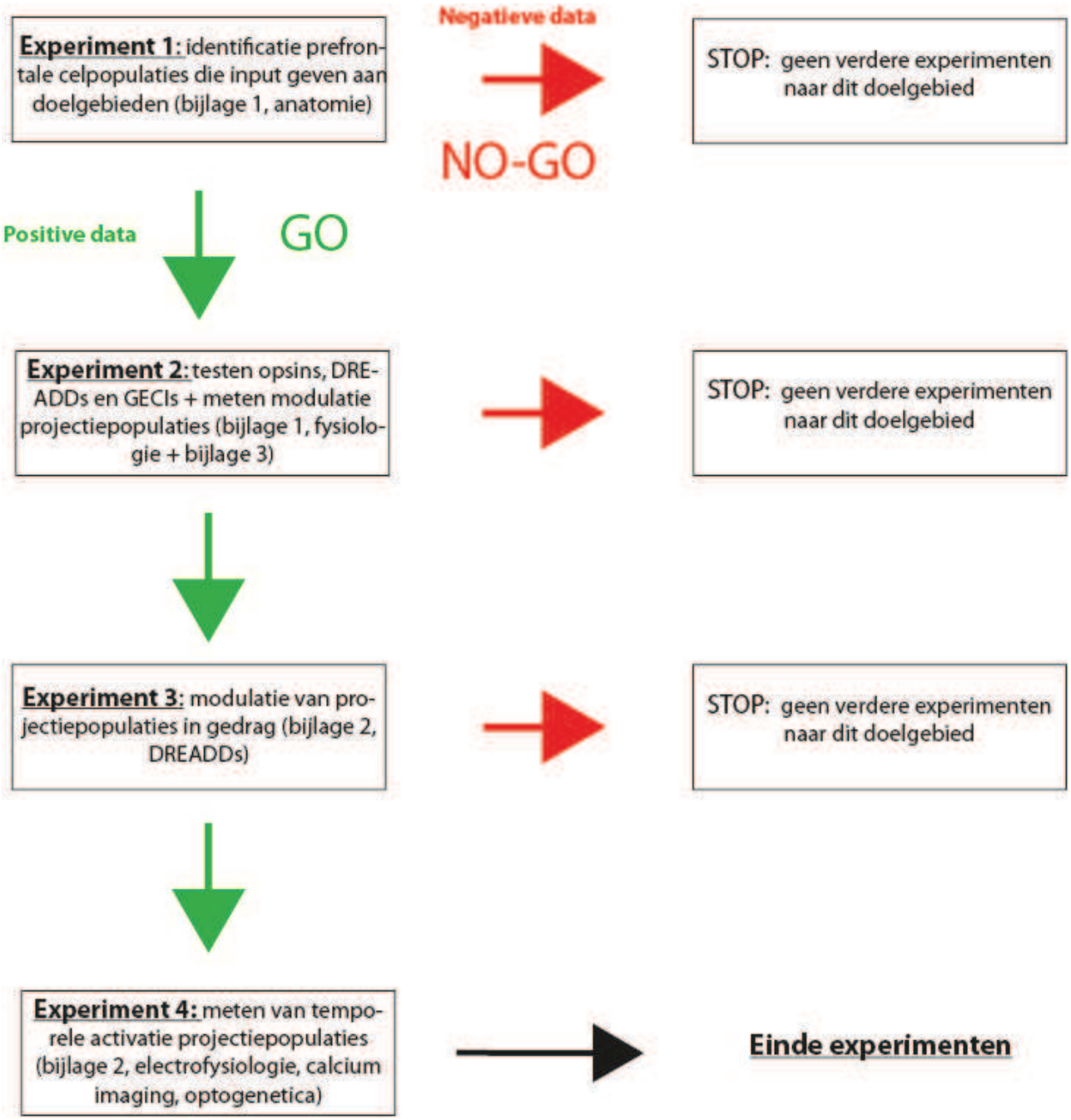
3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

Het overkoepelende doel van de studie is het ontrafelen van de rol van verschillende populaties pyramidaalcellen in de mPFC in cognitie en hoe deze gemoduleerd worden door acetylcholine. Door de activiteit van cellen te meten tijdens gedrag kunnen we meten hoe acetylcholine tijdens gedrag beïnvloed. Vervolgens willen we in hersenplakjes uitzoeken wat voor effect acetylcholine heeft op de activiteit en connectiviteit tussen cellen. Hierbij willen we gebruik maken van zowel muizen als ratten. Ratten presteren beter tijdens complexe gedragstaken terwijl voor fysiologische experimenten muizen het voordeel hebben dat er veel genetisch gemodificeerde lijnen beschikbaar zijn waardoor er cellen een marker hebben en/of specifiek de activiteit beïnvloedt kan worden door middel van licht of farmaca.

Na elke stap in het onderzoek zijn keuzemomenten waarop bepaald wordt wat de koers van het project wordt. Door te starten met tracing en het testen van de virus-constructen voor gedrag en/of elektrofysiologie kunnen we doelgebieden elimineren waarbij we geen connecties met de prefrontale cortex vinden of waarin de opsins of DREADD receptoren in vitro niet werken.

Door vervolgens de beoogde celpopulaties in gedrag uit te schakelen met DREADDs krijgen we een beeld van de bijdrage van elke celpopulatie in aandacht en impuls-inhibitie. *Alleen* de celpopulaties die bijdragen aan dit gedrag zullen verder onderzocht worden met neurofysiologische of imaging methodes. Tot slot kunnen we heel specifiek met optogenetica tijdens bepaalde tijdsintervallen deze populaties

uitzetten of activeren. Dit gebeurt dus alleen in de celpopulaties die sterke verbindingen laten zien met de mPFC, waarin de virus-constructen werken en waarbij inhibitie van deze populaties in de 5-choice taak een effect laat zien op aandacht en impuls-inhibitie.



Schema 1. Overzicht van de volgorde van experimenten binnen het onderzoek en de bijbehorende keuzemomenten. Bijvoorbeeld: na het uitvoeren van anatomische tracing studies (bijlage 1) wordt vastgesteld naar welke doelgebieden de prefrontale cortex projecteert. Alleen deze populaties neuronen in de prefrontale cortex die projecteren naar bepaalde doelgebieden ('projectiepopulaties') worden verder onderzocht. Doelgebieden die geen input krijgen van de frontale cortex worden voor verdere stappen uitgesloten.

Literatuurlijst gebruikte referenties CCD aanvraag.

Bari, A., Dalley, J. W., and Robbins, T. W. (2008). The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and impulse control in rats. *Nat. Protoc.* 3, 759–67. doi:10.1038/nprot.2008.41.

Brown, K. J., and Grunberg, N. E. (1995). Effects of housing on male and female rats: Crowding stresses males but calms females. *Physiol. Behav.* 58, 1085–1089. doi:10.1016/0031-9384(95)02043-8.

Freedman, R. (2014). α7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonists for Cognitive Enhancement in Schizophrenia. *Annu. Rev. Med.* 65, 245–261. doi:10.1146/annurev-med-092112-142937.

Friedman, A., Homma, D., Gibb, L. G., Amemori, K., Rubin, S. J., Hood, A. S., et al. (2015). A Corticostriatal Path Targeting Striosomes Controls Decision-Making under Conflict. *Cell* 161, 1320–1333. doi:10.1016/j.cell.2015.04.049.

Gabbott, P. L. A., Warner, T. A., Jays, P. R. L., Salway, P., and Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J. Comp. Neurol.* 492, 145–177. doi:10.1002/cne.20738.

Hoover, W. B., and Vertes, R. P. (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct. Funct.* 212, 149–79. doi:10.1007/s00429-007-0150-4.

Jentsch, J. D., and Taylor, J. R. (2003). Sex-related differences in spatial divided attention and motor impulsivity in rats. *Behav. Neurosci.* 117, 76–83. doi:10.1037/0735-7044.117.1.76.

Parnaudeau, S., O'Neill, P.-K., Bolkan, S. S., Ward, R. D., Abbas, A. I., Roth, B. L., et al. (2013). Inhibition of mediodorsal thalamus disrupts thalamofrontal connectivity and cognition. *Neuron* 77, 1151–62. doi:10.1016/j.neuron.2013.01.038.

Passetti, F., Chudasama, Y., and Robbins, T. W. (2002). The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. *Cereb. Cortex* 12, 1254–1268. doi:10.1093/cercor/12.12.1254.

Remmelink, E., Chau, U., Smit, A. B., Verhage, M., and Loos, M. (2017). A one-week 5-choice serial reaction time task to measure impulsivity and attention in adult and adolescent mice. *Sci. Rep.* 7, 42519. doi:10.1038/srep42519.

Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron* 89, 683–694. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.040.

Sarter, M., Lustig, C., and Taylor, S. F. (2012). Cholinergic contributions to the cognitive symptoms of schizophrenia and the viability of cholinergic treatments. *Neuropharmacology* 62, 1544–1553. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.12.001.

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.	
Volgnummer	Type dierproef
1	Rat anatomische en fysiologische studies
2	Ratten gedrag
3	Muizen elektrofysiologie
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Centrale Commissie Dierproeven

3.

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	De rol van de frontale cortex in aandacht en impulsiviteit
1.2	Looptijd van het project	5 jaar
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Hersenwetenschappen, fundamenteel, ratten, muizen, aandacht, impulsiviteit

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)

Aandacht en concentratie zijn van groot belang om normaal te functioneren in het dagelijks leven. Naast psychiatrische aandoeningen als aandachtstekortstoornis (ADD) en aandachtstekort-hyperactiviteitstoornis (ADHD) is aandacht vaak ook aangetast in andere, veel voorkomende ziektes zoals de ziekte van Alzheimer of depressie. We weten dat een aantal hersengebieden nauw betrokken zijn bij aandacht: met name de prefrontale cortex. Deze bestaat uit veel verschillende onderdelen, ontvangt informatie uit een groot deel van het brein en stuurt dit ook weer naar een groot deel van het brein door.

We weten dat dieren en mensen slechter aandacht aan specifieke gebeurtenissen in hun omgeving kunnen besteden als de prefrontale cortex minder goed functioneert. Het is nog niet duidelijk hoe alle verschillende

		onderdelen met elkaar samenwerken, en ook hoe alle inkomende en uitgaande informatie van belang is. Daarom willen we in dit project kijken hoe de prefrontale cortex precies werkt als een dier, en uiteindelijk de mens, ergens de aandacht op richt.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Na afloop van dit project verwachten we te weten hoe de verschillende onderdelen van de prefrontale cortex van invloed zijn op aandacht, en weten we ook wat daarin de rol is van de hersengebieden die informatie uitwisselen met de prefrontale cortex. Wetenschappelijk gezien is dit nog onbekend terrein: tot nu toe heeft onderzoek zich beperkt tot het stilleggen van de hele prefrontale cortex. Wij willen dus verder gaan door de functionele populaties van de frontale cortex te karakteriseren. Het maatschappelijk belang is groot, doordat we met completere kennis over de werking van de prefrontale cortex gerichter op zoek kunnen naar een behandeling voor aandachtsstoornissen, en symptoombestrijding in ziektes waar aandacht aangetast is. Daarnaast leren we meer over de manier waarop de hersenschors georganiseerd is: informatie die vrijwel zeker toepasbaar is op andere delen van de schors.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	We gebruiken hier zowel ratten als muizen, en we verwachten de volgende aantallen nodig te hebben: Ratten: maximaal 1780 Muizen: maximaal 2090
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De proefdieren zullen een operatie ondergaan, waarbij een virus wordt geïnjecteerd en ze in sommige gevallen een klein implantaat in het brein krijgen. Daarna worden ze getraind in een aandachtstaak. Tijdens de training worden de dieren individueel gehuisvest en krijgen ze weinig eten, om voldoende gemotiveerd te zijn om de gedragstaak uit te voeren, waar ze voedsel mee verdienen. De dieren hebben onbeperkt toegang tot drinken. Tijdens de taak zelf worden de dieren ofwel geïnjecteerd, ofwel aangesloten aan een kabeltje om hersenactiviteit te meten. Deze handelingen worden ingeschaald als matig ongerief. De dieren worden verder elke dag gecontroleerd en het verblijf in de kooi wordt zo aangenaam mogelijk gemaakt. Aan het einde van het experiment, of bij het voortijdig bereiken van een humaan eindpunt, worden de dieren gedood.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Het geschatte ongerief is maximaal matig voor 100% van de dieren.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden na de proeven gedood om de hersenen te kunnen bestuderen.

4 Drie V's

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom	De fundamentele kennis over de werking van de prefrontale cortex die we uit dit soort experimenten halen, kunnen we niet uit onderzoek bij mensen krijgen. Methodes als fMRI en PET hebben niet de resolutie om specifieke hersencellen of kleine groepen cellen bij een levend mens vast te leggen. We kunnen het ook niet met stamcellen of computersimulaties

proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	onderzoeken: met geen van beide methoden is het nu mogelijk een levend wezen te simuleren. Het onderzoek kunnen we goed bij ratten en muizen uitvoeren, omdat we daar wel alle hersengebieden en losse hersencellen goed kunnen bereiken. Ratten en muizen lijken evolutionair gezien dusdanig veel op mensen, dat de kennis die we uit dit onderzoek halen goed vertaalbaar is.
4.2 **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Door gebruik te maken van ons werkplan met een aantal keuzemomenten, in elke fase van het onderzoek, is het makkelijk om in een vroeg stadium van het project te besluiten of het voor het onderzoek zin heeft om door te gaan met een bepaalde celpopulatie of niet. Hiervoor kijken we eerst naar de meest veelbelovende richtingen: dat kunnen verbindingen naar andere hersenengebieden zijn, of juist inkomende informatie in het brein, of een subonderdeel van de prefrontale cortex. Daarnaast hebben we ook per experiment berekend wat de kleinst mogelijke groepsgrootte is om met redelijke zekerheid te zeggen of een experimenteel resultaat wel of niet van belang is. Tenslotte heeft onze onderzoeksgroep veel expertise met soortgelijke experimenten, waardoor de uitval van dieren ook nog beperkt zal zijn, en werken we samen met andere onderzoeksgroepen die ook veel ervaring hebben met dit type onderzoek.
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 gaan onderzoeken hoe de prefrontale cortex werkt als er gericht aandacht aan iets wordt besteed. Ratten zijn ideaal voor gedragsonderzoek, omdat ze het vermogen hebben om aandachtstaken binnen afzienbare tijd te leren, het rattenbrein grote overeenkomsten heeft met dat van mensen, en omdat voor ratten ook diverse virale gereedschappen beschikbaar zijn die we nodig hebben voor gedragsonderzoek. Daarnaast willen we muizen gebruiken omdat er transgene muislijnen beschikbaar zijn die het mogelijk maken om verschillende prefrontale celtypen te kunnen identificeren en de activiteit van deze cellen te kunnen remmen of stimuleren.
Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Getrainde wetenschappers voeren de operaties uit. Alle dieren worden onder diepe anesthesie gebracht voor aanvang van operaties en tijdens de operatie wordt pijnstilling gegeven aan de dieren om het ongerief zo laag mogelijk te houden. De dieren zullen eens per dag worden gecontroleerd. Ook zijn er humane eindpunten gedefinieerd om onnodig lijden te voorkomen, maar de kans hierop is klein (<3%). Voordat er meer dan matig optreedt worden de humane eindpunten toegepast.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

4.

Bijlage
Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 1 Type dierproef: Rat anatomische en fysiologische studies

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Als eerste stap willen we vaststellen waar de projectieneuronen zich binnen de mPFC bevinden. Daarnaast willen we weten of onze verschillende virale constructen goed tot expressie komen. Anders is het immers niet mogelijk om gedragsveranderingen teweeg te brengen. We kunnen dit doen door een retrograad virus in de doelgebieden te infuseren. Dit virus zal cre-recombinase tot expressie brengen in celpopulaties die projecteren naar dit doelgebied, in dit geval dus ook de mPFC. Vervolgens kunnen we tijdens dezelfde operatie een virus infuseren in de mPFC, welke een fluorescent eiwit tot expressie brengt in alleen die cellen die naar voorgenoemd doelgebied projecteren. Wanneer de virussen tot expressie zijn gekomen worden de ratten gedood en het brein geïsoleerd om de anatomie verder te bestuderen in hersenplakjes. Hier kunnen we kwalitatief bepalen of er goede expressie is.

Als tweede willen we door een opsin, GECI of DREADD-receptor tot expressie te brengen in de mPFC subpopulatie de fysiologische effecten van deze ingebouwde eiwitten op neuronale activiteit meten. Hierdoor kunnen we beter begrijpen wat de effecten van onze manipulaties in het intacte dier zijn. Dit doen we door na virusinjectie het dier te perfuseren en in de plakjes van het brein individuele cellen te meten, met een glazen electrode. Hier kijken we onder andere naar veranderingen in membraanpotentiaal, vuurfrequentie en communicatie met andere neuronen.

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

Een of twee weken na levering zullen de ratten eenmaal een operatie ondergaan waarin de virussen worden geïnfuseerd. Deze operatie zal maximaal twee uur duren. De dieren krijgen voor de operatie adequate pijnstilling toegediend en zullen, na anesthesie in een stereotact geplaatst worden. Er zullen gaten geboord

worden in de schedel boven het doelgebied en boven de mPFC. Met een zeer fijne, steriele pipet worden de virussen geïnfuseerd. Na herstel zal het dier in de thuiskooi verblijven tot het virus tot expressie is gekomen. Dit zal per virus variëren van 3 weken tot maximaal 4 maanden. Hierna zal het dier geperfuseerd worden.

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

De anatomie-experimenten zijn kwalitatieve proeven dus de uitkomsten zijn moeilijk uit te drukken in statistische significanties. We gaan uit van 3 a 4 ratten per doelgebied (Friedman et al., 2015). We willen graag retrograde infusies en anterograde infusies doen en expressie van opsins en DREADD receptoren testen voor we verder gaan met gedrag. Schattingen voor aantallen dieren voor elektrofysiologische experimenten zijn bepaald door ervaring hier op de afdeling met deze techniek en pilot experimenten. In de literatuur zien we dat 10-15 cellen per deelvraag voldoende zijn voor een onderbouwd antwoord (Parnaudeau et al., 2013).

B. De dieren

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

Voor deze experimenten gebruiken we ratten. Dit is nodig voor de anatomie en fysiologie experimenten aangezien we de met anatomie gevonden projecties willen testen in gedrag met deze diersoort. We hebben voor de rat gekozen vanwege de complexe aard van de gedragstaak en de technische moeite die de experimenten zouden kosten in muizen.

We zullen alleen mannetjesratten gebruiken van de stam Long Evans of Chat-Cre transgene ratten met Long Evans genetische achtergrond van eigen fok voor onderzoek naar cholinerge populaties. We willen alleen mannetjesratten gebruiken omdat gemeten parameters in de 5CSRTT verschillen voor mannetjes en vrouwtjesratten (Jentsch et al., 2003). Ook is de gecombineerde huisvesting van mannelijke en vrouwelijke ratten niet mogelijk doordat vrouwelijke ratten nadelige effecten hebben op de hanteerbaarheid ~~hebben~~ van mannelijke ratten. Daarnaast is uit de literatuur bekend dat individuele huisvesting voor vrouwelijke dieren stressvoller is dan voor mannelijke dieren. Gebaseerd op deze resultaten heeft het dus voorkeur om uitsluitend mannelijke ratten te gebruiken vanwege de noodzaak dieren individueel te huisvesten (Brown et al., 1995). Ratten zullen worden besteld op een leeftijd van ongeveer 7 weken. Experimenten kunnen tot ongeveer 4 maanden na aankomst van de dieren duren, afhankelijk van de expressie tijd van de gebruikte virussen.

We willen tijdens de tracing experimenten met virale constructen onderscheid maken tussen projecties van de ventrale mPFC (vmPFC) en dorsale mPFC (dmPFC). In de literatuur is er voor verschillende doelgebieden en differentiële innervatie bekend vanaf de mPFC voor dorsale en ventrale subgebieden (Gabbott et al., 2005). Ook is er op gedrag een onderverdeling bekend tussen dmPFC en vmPFC (Passetti et al., 2002). Zie tabel 1 voor de berekening van de groepsgroottes voor deze experimenten. De (x2) betekent dat we de populaties in zowel de dmPFC als vmPFC gaan bestuderen.
Belangrijk bij het lezen van de tabel is dat dit om een ***maximaal*** aantal dieren gaat. Immers, als we tijdens de initiële tracing experimenten geen expressie zien van het virus heeft het geen zin om verder te gaan met opto / DREADD expressie testen of fysiologische experimenten.

We gaan 5 experimenten doen op 10 verschillende projecties voor de dmPFC of vmPFC. Dit zijn projectiegebieden waarvan in de literatuur sterke aanwijzingen zijn dat deze verbonden zijn met de prefrontale cortex en betrokken zijn bij cognitie. We weten van literatuur (Friedman et al., 2015) dat we ongeveer 3 a 4 dieren nodig hebben in een groep om betrouwbaar expressie te testen of duidelijke anatomische conclusies te trekken. Aangezien we precieze virus-infusies op twee verschillende coördinaten uitvoeren, het doelgebied en in de PFC, verwachten we op basis van vorige experimenten in ons lab een uitval van ongeveer 30%. Dit betekent dat we 5 dieren per groep nodig hebben om betrouwbaar conclusies te kunnen trekken.

Dieren per experiment:
10 (projecties) **x 2** (dorsale en ventrale PFC) x **5** (groepsgrootte per experiment) **= 100 ratten per experiment.**

Voor 5 experimenten totaal: 100 * 5 = 500 ratten (zie Tabel 1)

Tabel 1. Dierverbruik in voorgestelde experimenten.

Experiment	Groepen	N / groep	N totaal
1. Tracing	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2, dmPFC + vmPFC)	5	10*5*2=100
2. Testen opsin	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
3. Ephys opsin	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
4. DREADD	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
5. GECI	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (x2)	5	10*5*2=100
			Σ_N=500

MDT: mediodorsaal thalamus / BLA: basolaterale amygdala / DS: dorsaal striatum / VS: ventraal striatum / SC: superior colliculus / FOF: frontal orienting fields / ILN: intralaminaire nucleus van de thalamus / VTA: ventral tegmental area / BF: basale voorbrein / Ach-INT: cholinerge interneuronen PFC.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.
Vermindering:
We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen. Op basis van deze literatuur hebben we zorgvuldig afgewogen projectiegebieden gekozen en zeer veel andere projectiegebieden van de mPFC weg gelaten. Daarnaast gaan we trapsgewijs te werk waarbij er per stap het gebruik van groepen ratten afvallen doordat sommige groepen niet betrokken zullen zijn in de gemeten parameters van onze gedragstaak. Tot slot zijn de gebruikte virussen de nieuwste technologie waardoor de grootste hoeveelheid neuronen geïnfecteerd worden. Hierdoor is het gemeten effect zo groot mogelijk en kunnen dieren bespaard worden.
Verfijning:
De operatie en perfusie die de dieren zullen ondergaan wordt uitgevoerd onder diepe anesthesie. Ook zal er waar nodig analgesie gegeven worden om ongerief zoveel mogelijk te verminderen. Op de afdeling heeft het personeel veel ervaring met de operatie en met perfusies.

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

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijden adequate peri-operatieve pijnstilling worden toegepast. Verder zullen alle operaties en perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie. Na een operatie worden de dieren 2 dagen extra gecontroleerd op gewicht en gezondheid en zonodig pijnbestrijding toegediend.
Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle GGO dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Er is in het verleden onderzoek gedaan naar projectieneuronen van de mPFC (Gabbott et al., 2005). In dit paper gebruiken ze echter grote hoeveelheden van een aspecifieke retrograde tracer. Deze methode heeft het nadeel dat er geen celspecifieke conclusies getrokken kunnen worden en dat hele grote gebieden in het brein met de tracer geïnfuseerd zijn. Dit is lastig voor kleine gebieden zoals de mediodorsala thalamus. Door middel van nieuwe, specifiekere technieken kunnen we zeker zijn van precieze, populatie-specifieke tracing.

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.

De hoofdhuid wordt verdoofd. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden en tijdens de operatie bevindt het dier zich onder algehele anesthesie. Postoperatieve pijnstilling zal gegeven worden om postoperatieve pijn tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t

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.

De volgende humane eindpunten zullen worden gehanteerd:

- Verlies van lichaamsgewicht: > 15% in 24 uur.
- Bewegingsloosheid: als de rat na herstel van de operatie een suppressie van activiteit vertont in zijn thuiskooi wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Abnormale houding: als de rat voor een langdurige periode geen normale houding kan volhouden wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.

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

<3%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Handeling	**Inschaling**	**Duur**
Anesthesie	licht (100%)	2 uur
Virusinjectie	matig (100%)	2 uur
Perfusie onder verdoving	terminaal (100%)	15 minuten

Het cumulatieve 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 huidige anatomische en elektrofysiologische technieken laten niet toe
om in een intact brein te werken. Hierdoor zullen we het brein uit de rat moeten halen en dit kan niet anders dan door de dieren te doden.

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

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

☒ Ja

5.

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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Rat gedrag

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit onderzoek kijken we of en wanneer bepaalde mPFC projectieneuronen betrokken zijn in aandacht en impuls-inhibtie.

Eerst kijken we of de verschillende projecties een rol spelen in aandacht in impuls-inhibitie. We doen dit met chemogenetische manipulatie van specifieke neuronale populaties tijdens de 5-choice serial reaction time task (5-CSRTT), een aandachts en impuls-inhibitie taak.

We injecteren tijdens een operatie twee virussen. In het doelgebied infuseren we een retrograad virus welke cre-recombinase tot expressie brengt in de afferente gebieden. Ook infuseren we een virus in de PFC met de DREADD receptor, welke afhankelijk is van de expressie van cre. Deze procedure geeft ons de mogelijkheid om in zeer specifieke populaties een virus tot expressie te brengen.

Na herstel van de operatie worden ze getraind in de 5-CSRTT. Bij aanvang van de training worden de ratten ook op voedselrestrictie gezet. Hiervoor zullen de ratten genoeg gehandeld worden om te wennen aan de onderzoekers.

Als de ratten de taak goed genoeg kunnen begint de testfase waarbij gekeken wordt naar de individuele prestatie van de rat in de taak. De dieren worden eerst een aantal dagen gehabituueerd aan *i.p. of s.c.* injecties met de dragervloeistof van de DREADD agonist. Na habituatie aan de injecties begint het daadwerkelijke experiment, waarbij we afwisselend de ratten injecteren met een ligand voor een DREADD-receptor of saline of alleen fixeren. We verwachten dat de modulatie van specifieke projectieneuronen met DREADDs leidt tot veranderingen in de prestatie op de taak.

In samenhang met de resultaten in de chemogenetische experimenten hierboven besluiten we of we de celpopulaties verder willen bestuderen. Als we een verandering in performance in de 5-CSRTT zien, gaan we kijken wanneer de celpopulatie precies actief is tijdens de taak. Dit doen we door middel van elektrofysiologie en *calcium imaging* in het bewegende dier.

In electrofysiologische experimenten injecteren we tijdens een operatie weer de twee verschillende virussen (een retrograad en een opsin) zodat we expressie krijgen van een modulerend opsin in de specifieke celpopulatie die we willen onderzoeken. Tijdens dezelfde operatie krijgt de rat ook een headstage geïmplanteerd, die onder andere electroden en een lichtbron bevat, zodat we elektrische activiteit in het brein kunnen meten, en de opsins met licht kunnen bereiken. Na de operatie mogen de ratten herstellen voordat ze naar de gedragsruimte gaan en daar worden getraind in de 5-CSRTT. Als de ratten getraind zijn, kunnen we elektrische signalen van de neuronen meten en zodoende zien wanneer ze actief zijn. Met behulp van de specifieke labeling van projectieneuronen met opsines kunnen we de activiteit van deze groep volgen gedurende de taak.

Via calcium imaging kunnen we daarnaast ook kijken naar de gehele populatie in een bepaald gebied. De operatie is qua virussen wederom hetzelfde, met in dit geval als doel om door middel van een retrograad virus een GECI op de juiste plek tot expressie te brengen. De ratten krijgen hier een optische vezel of een lens geïmplanteerd, en worden na de operatie individueel gehuisvest. Ze worden vervolgens getraind in de 5-CSRTT, en daarna gehabitueerd aan kabels, die we aan de optische vezel kunnen aansluiten en zodoende de vrijkomende fluorescentie van de GECI naar een detector kunnen geleiden. De temporele resolutie van calcium imaging is weliswaar een stuk kleiner dan die van elektrofysiologie, maar daartegenover staat dat we met imaging wel een veel groter aantal cellen kunnen meten. Het is daarom dan ook essentieel dat we allebei de methoden gebruiken om vast te stellen wanneer de neuronale populatie actief is.

Als we vinden dat de celpopulatie die we bekijken inderdaad actief is tijdens de 5-CSRTT, kunnen we met grotere precisie de neuronen gaan manipuleren. Dat doen we door middel van optogenetica. De operatie is wederom redelijk hetzelfde als voor elektrofysiologie en imaging: we injecteren weer twee virussen, waarbij een retrograad virus ook weer zorgt voor expressie van een opsin in de juiste populatie. Daarna implanteren we twee lichtbronnen in het targetgebied. Na herstel van de operatie worden de ratten getraind in de 5-CSRTT. De ratten worden hiertoe aangesloten op een kabel, waarmee we licht op de juiste hersencellen schijnen en hun activiteit daarmee beïnvloeden. Nu we weten dat de cellen actief zijn tijdens de taak, verwachten we dat als we ze op precies de goede momenten (zoals gezien bij elektrofysiologie en imaging) manipuleren, we een verandering in performance in de 5-CSRTT gaan zien.

We zullen ons in eerste instantie vooral richten op een aantal gebieden waarvan we weten dat ze van invloed zijn op aandacht en impuls-inhibitie, of vergelijkbare cognitieve capaciteiten zoals cognitieve flexibiliteit. Deze gebieden zijn in bijlage 1 ook al benoemd.

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 ratten zullen na een tot twee weken acclimatisatie eenmaal een operatie ondergaan waarin de virussen worden geïnfuseerd. Deze operatie zal maximaal 2 uur duren voor alleen virus injecties en maximaal 4-6 uur wanneer er een implantaat aangebracht moet worden. Alle dieren krijgen voor de operatie adequate pijnstilling toegediend en zullen na anesthesie in een stereotact geplaatst worden. Er zullen gaten geboord worden in de schedel boven het doelgebied en boven de mPFC. Met een zeer fijne, steriele pipet worden de virussen geïnfuseerd. Wanneer er naast een virusinjectie ook een implantaat aangebracht wordt zal deze zorgvuldig met tandartscement op zijn plek gezet worden. Hierna zal het dier een week herstellen waarna het verplaatst wordt naar de testomgeving. Hier zullen de dieren tot maximaal een week acclimatiseren. Hierna worden de ratten getraind in de 5-CSRTT met een duur van ongeveer een tot acht weken tot ze stabiel presteren. Tijdens de training leren ratten om te reageren op een van de 5 lichtjes in de muur van de gedragskooi die op een random plek aangaat na een aantal seconden. Wanneer de rat de hier goed op reageert verdient hij een pellet. Het aantal correcte, incorrecte, premature responses en de snelheid van responses gebruiken we als maat van aandacht en impuls-inhibitie. Hierna zullen de dieren worden geperfuseerd om in hersenplakjes te onderzoeken of het virus en implantaat op de juiste plek zitten. In totaal zullen dieren maximaal 6-7 maanden in het experiment zitten vanaf het moment van levering tot

perfusie. Hierbij moet wel bedacht worden dat hier erg veel variatie in kan zitten, afhankelijk van tijd voor virusexpressie en testdagen.

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

Afhankelijk van het experiment krijgen we verschillende soorten uitkomsten. In de experimenten waarin we hersenactiviteit manipuleren is onze output het resultaat in de 5-CSRTT. Hier gebruiken we ANOVA om significante verschillen tussen groepen en tussen verschillende condities in hetzelfde dier te bepalen. In experimenten waar we kijken naar neuronale activiteit bepalen we de activiteit van individuele neuronen of populaties tijdens de 5-CSRTT.

In onze ervaring is er in proefdiermodellen voor complexe cognitie en diergedrag in het algemeen een grote mate van variatie. We hebben daarom 16 ratten per experimentele groep voor manipulatie en activiteitsmetingen van neuronale populaties toegewezen. In dit aantal hebben we ook alle eventuele uitval van proefdieren meegenomen, zoals bijvoorbeeld mislukte virusinjecties of operaties en ratten die de taak niet aanleren. Uit ervaring weten we dat deze uitval ongeveer 20% is. We houden daarmee per groep ten minste 12 dieren over voor statistische analyse, wat genoeg is om een statistisch significant effect te vinden, ook als we de natuurlijke variatie in gedragsonderzoek in acht nemen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten gebruiken we ratten. Dit is nodig voor de anatomie en fysiologie experimenten aangezien we de met anatomie gevonden projecties willen testen in gedrag met deze diersoort. We hebben voor de rat gekozen vanwege de complexe aard van de gedragstaak en de technische moeite die de experimenten zouden kosten in muizen.

We zullen alleen mannetjesratten gebruiken van de stam Long Evans of Chat-Cre transgene ratten met Long Evans genetische achtergrond van eigen fok voor onderzoek naar cholinerge populaties. Omdat de gemeten parameters onder invloed kunnen zijn van oestrogenen willen we voorkomen dat de oestrogeencyclus van vrouwen invloed heeft op onze resultaten. Ook is de gecombineerde huisvesting van mannelijke en vrouwelijke ratten niet mogelijk doordat vrouwelijke ratten nadelige effecten hebben op de handelbaarheid hebben van mannelijke ratten. Ratten zullen worden besteld op een leeftijd van ongeveer 7 weken. Experimenten kunnen tot ongeveer 6 maanden na aankomst van de dieren duren, afhankelijk van de expressietijd van de gebruikte virussen.

We zullen ons in eerste instantie vooral richten op een aantal gebieden waarvan we weten dat ze van invloed zijn op aandacht en impuls-inhibitie, of vergelijkbare cognitieve capaciteiten zoals cognitieve flexibiliteit. Deze gebieden zijn in Bijlage 1 (tracing-experimenten) ook al benoemd. Voor al deze targetgebieden kijken we eerst of we met DREADDs iets zien, op basis daarvan kijken we naar de timing van activiteit met elektrofysiologie en imaging, en aan de hand van die resultaten gaan we voor specifieke manipulatie met optogenetica.

Door deze trapsgewijze aanpak proberen we het aantal proefdieren zo laag mogelijk te houden. In Tabel 1 staat het aantal dieren dat we denken te gebruiken voor al deze experimenten, maar let op dat dit dus om het absolute maximum aantal dieren gaat.

Tabel 1. Dierverbruik in voorgestelde experimenten.

Experiment	Groepen	N/groep	N totaal
1. Chemogenetics	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT (2x, dorsale en ventrale PFC)	16	10 (aantal projecties) *16 (N/groep)*2 (dm + vm PFC) =320

2. In vivo elektrofysiologie	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT	16	10*16*2=320
3. In vivo calcium imaging	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT	16	10*16*2=320
4. Optogenetica	MDT, BLA, DS, VS, SC, FOF, ILN, VTA, BF, Ach-INT	16	10*16*2=320
			∑N=1280

MDT: mediodorsaal thalamus / BLA: basolaterale amygdala / DS: dorsaal striatum / VS: ventraal striatum / SC: superior colliculus / FOF: frontal orienting fields / ILN: intralaminaire nucleus van de thalamus / VTA: ventral tegmental area / BF: basale voorbrein / Ach-INT: cholinerge interneuronen PFC.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.
Vermindering:
We gebruiken zo min mogelijk dieren door eerst goed de literatuur te raadplegen. Op basis van deze literatuur hebben we zorgvuldig afgewogen projectiegebieden gekozen en zeer veel andere projectiegebieden van de mPFC weg gelaten. Daarnaast gaan we trapsgewijs tewerk waarbij er per stap het gebruik van groepen ratten afvallen doordat sommige groepen niet betrokken zullen zijn in de gemeten parameters van onze gedragstaak. De gebruikte virussen zijn de nieuwste technologie waardoor de grootste hoeveelheid neuronen geïnfecteerd worden en het gemeten effect zo groot mogelijk is. Daarnaast hebben we voor de elektrofysiologie en calcium imaging de nieuwste technieken waarbij we zoveel mogelijk cellen tegelijkertijd kunnen meten en hierdoor de power van de studie toeneemt. Tot slot hebben we geen extra dieren voor controlegroepen nodig omdat we kunnen controleren voor licht (optogenetica) en CNO (DREADDs) in hetzelfde dier.
Verfijning:
We hebben de mogelijkheid om ratten te trainen in hun thuiskooi. Hierdoor zijn de ratten minder gestrest, is de trainingstijd gereduceerd van drie maanden naar maximaal een maand en het aantal gemeten trials pers sessie twee tot drie keer hoger als op de conventionele manier van trainen. De operatie en perfusie die de dieren zullen ondergaan wordt uitgevoerd onder diepe anesthesie. Ook zal er waar nodig analgesie gegeven worden om ongerief zoveel mogelijk te verminderen. Op de afdeling heeft het personeel veel ervaring met de operatie en met perfusies.

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

Alle experimenten worden uitgevoerd via de daarvoor geldende richtlijnen. Er zal te allen tijden adequate pijnstilling worden toegepast. Verder zullen alle operaties en perfusies worden uitgevoerd onder diepe anesthesie. Na een operatie worden de dieren 2 dagen extra gecontroleerd op gewicht en gezondheid en krijgen ze eventueel pijnbestrijding toegediend.
Om milieueffecten tot een minimum te beperken volgen we de richtlijnen en regels van bureau GGO. Dit betekent dat alle GGO dieren in barrière eenheden worden gefokt, en alle experimenten worden uitgevoerd via de door bureau GGO opgestelde richtlijnen.

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.

De technieken die we gebruiken zijn dusdanig nieuw dat er nog maar een paar jaar mee gepubliceerd is, en voor zover wij weten heeft niemand nog iets over ons onderwerp geschreven. We staan bovendien in nauw contact met andere groepen in hetzelfde veld over de hele wereld, waarvan we ook weten dat ze niet met precies hetzelfde onderzoek bezig zijn. Wij achten de kans dat deze gedragsexperimenten al eerder zijn uitgevoerd vrijwel nihil.

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 individueel gehuisvest, omdat ze in experiment 2, 3 en 4 kostbare en kwetsbare apparatuur geïmplanteerd hebben gekregen. Uit ervaring is al gebleken dat de kans aanwezig is dat de implantaten kapot gaan als dieren samen gehuisvest zijn. Ook tijdens het trainen en testen in de CombiCage zullen de dieren individueel moeten worden gehuisvest. Dit omdat de CombiCage zodanig gemaakt is dat hij alleen individueel gehuisveste dieren aan kan. Maar de CombiCage betekent wel dat de dieren uiteindelijk weken tot maanden korter in de taak zullen zitten ten opzichte van de conventionele gedragstaak.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Het dier wordt onder algehele verdoving gebracht tijdens de gehele operatie. De hoofdhuid wordt verdoofd. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. Postoperatieve pijnstilling zal gegeven worden om postoperatieve pijn tegen te gaan.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t.

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.

De volgende humane eindpunten zullen worden gehanteerd:

- Verlies van lichaamsgewicht: >15% in 24 uur.
- Bewegingloosheid: als de rat na herstel van de operatie zich niet kan rondbewegen in zijn thuiskooi wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Abnormale houding: als de rat voor een langdurige periode geen normale houding kan volhouden wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Verliezen van implantaat (Wij schatten de kans hierop <5%)

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

<3%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeldzaam.

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.

Handeling	**Inschaling**	**Duur**
Anesthesie	matig (allen)	1x voor2-6 uur
Virusinjectie	matig (allen	1 2-6 uur
Implantaat aanbrengen	matig (Calcium imaging, elektrofysiologie, optogenetics)	1x voor 2-6 uur
Individuele huisvesting	matig (allen)	2-7 maanden
Voedsel restrictie	matig (allen)	2-7 maanden
i.p. of s.c. injecties voor DREADD ligand CNO	licht (DREADDs)	<2 min per injectie, 1-3 weken

Aansluiten voor recordings	licht (Calcium imaging, elektrofysiologie, optogenetics)	dagelijks 2 min per dier voor 2-7 maanden
Perfusie onder verdoving	terminaal (allen)	15 minuten

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.

Na experimenten is het essentieel om te controleren of je implantaat en virus expressie zich op de juiste plek bevond. Dit om de betrouwbaarheid van de experimenten hoog te houden. Hierdoor zullen we het brein uit de rat moeten halen en dit kan niet anders dan door de dieren te doden.

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

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

☒ Ja

6.

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.	11200
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Vrije Universiteit Amsterdam
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 3 Type dierproef: Muis fysiologische studies

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In deze experimenten wilen we onderzoeken hoe verschillende inputs naar de mPFC de activiteit van individuele neuronen en verbindingen tussen neuronen beïnvloedt. Door gebruik van opsins of DREADDs is het mogelijk om inputs naar de mPFC te activeren of te remmen. Hierbij maken we gebruik van dieren die cre tot expressie brengen in bepaalde celtypen waardoor er door middel van virusinjecties zodat er specifieke modulatie mogelijk is van verschillende inputs. Daarnaast willen we gebruik maken van dieren die dmv genetische modificatie al opsins hebben. In deze dieren is er geen virusinjectie nodig waardoor het ongerief aanzienlijk minder is en er minder variabiliteit is die veroorzaakt kan worden door verschil in injectie hoeveelheid of locatie. Daarnaast willen we gebruik maken van verschillende muislijnen die fluorescente markers tot expressie brengen in specifieke celtypen zodat we deze kunnen identificeren.
In hersenplakjes kunnen we de activiteit van enkele neuronen meten. Door licht op de plakjes te schijnen kunnen we opsins activeren waardoor de activiteit van inputs gestimuleerd of geremd wordt. Hierbij kijken we naar de sterkte van connecties tussen neuronen, plasticiteit en intrinsieke cel eigenschappen.

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 waarbij geen injecties plaatsvinden worden gedecapiteerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie. Dit wordt zonder anesthesie gedaan aangezien dit mogelijk invloed kan hebben op de fysiologische metingen.
De dieren zullen na een tot twee weken acclimatisatie eenmaal een operatie ondergaan waarin de virussen worden geïnfuseerd. Dit is een eenmalige ingreep van maximaal 2 uur.
Minimaal een uur voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden.
Alle dieren krijgen voor de operatie adequate pijnstilling toegediend en zullen na anesthesie in een

stereotact geplaatst worden. De huid over de schedel zal worden geschoren en worden ontsmet. De huid zal verdoofd worden en worden ingesneden en teruggetrokken zodat de schedel zichtbaar wordt. Gaten zullen worden geboord in de schedel om toegang te krijgen tot de hersenen van de muis. De locatie van de gaten zal worden bepaald aan de hand van een anatomische atlas. Een kleine, scherpe pipet met virus zal met behulp van de stereotact in de hersenen worden gebracht en een precieze hoeveelheid virus zal worden geïnjecteerd. De pipet zal worden teruggetrokken waarna de hoofdhuid weer zal worden dichtgemaakt.
Na 3-4 weken is er voldoende expressie van het virus en zal het dier worden geprepareerd voor het snijden van hersenplakjes voor fysiologie. De dieren blijven maximaal 8 weken na operatie staan.

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

Schattingen voor het aantal proeven en het aantal dieren dat benodigd is zijn gebaseerd op eerder uitgevoerde pilot experimenten en ervaring. In de literatuur is doorgaans een tiental cellen voldoende om een statistisch onderbouwde conclusie te trekken. Omdat er meerdere plakjes gemaakt kunnen worden in 1 dier is het mogelijk om meerdere metingen te doen in een dier. Echter omdat de connectiviteit in hersenplakjes erg afhankelijk is van de hoek waaronder het weefsel is gesneden is het aantal metingen per dier erg variabel. De hoeveelheid dieren zijn dan ook een maximaal aantal, en omdat er maar 1-2 dieren per dag gemeten kunnen worden per onderzoeker is het mogelijk dat als er genoeg cellen gemeten zijn het aantal dieren naar beneden bij te stellen.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten gebruiken we muizen. Omdat er in dit onderdeel geen gedrag experimenten worden gedaan is het niet nodig om ratten te gebruiken. Muizen geven meer mogelijkheden vanwege de beschikbaarheid van verschillende lijnen met genetische modificaties, daarnaast zijn connecties zowel van en naar de mPFC als binnen de mPFC vergelijkbaar tussen deze diersoorten.

1. Modulatie van mPFC connectiviteit door acetylcholine:
Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in cholinerge neuronen, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt, door ervaring weten we dat er geen verschil is tussen beide geslachten. Wel kijken we altijd of resultaten verschillen tussen mannetjes en vrouwtjes. Met elektrofysiologisch technieken in plakjes van de PFC kunnen we de connectiviteit tussen enkele cellen meten en tegelijkertijd met licht de afgifte van acetylcholine beïnvloeden. Hierbij kijken we connectiviteit en intrinsieke cel eigenschappen. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we de effecten onderzoeken van acetylcholine afgifte op connecties tussen cellen binnen dezelfde laag (4 groepen)als op connecties tussen lagen (10 groepen) met 4 verschillende opsins (14 connecties *4 opsins/DREADDs *10 n=560 dieren). Daarnaast willen we ook in wild-type dieren kijken hoe farmacologische activatie of remming van acetylcholine in hersenplakjes deze connecties beïnvloed ((14 connecties *2 farmaca *10 n=280 dieren)). In totaal zijn er dus 840 (560 + 280) dieren nodig voor deze experimenten.

2. Modulatie van mPFC plasticiteit door acetylcholine:
Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in cholinerge neuronen, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Met elektrofysiologisch technieken in plakjes van de PFC kunnen we de activiteit van enkele cellen meten en tegelijkertijd met licht de afgifte van acetylcholine beïnvloeden. Hierbij kijken we connectiviteit en intrinsieke cel eigenschappen. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we de effecten onderzoeken van acetylcholine afgifte op plasticiteit in 5 verschillende neuron typen met 4 verschillende opsins (5 cel typen *4 opsins/DREADDs *10 n=200 dieren). Daarnaast willen we ook in wild-type dieren kijken hoe farmacologische activatie of remming van acetylcholine in hersenplakjes deze connecties beïnvloed (5 cel typen *2 farmaca *10 n=100 dieren). In totaal zijn er dus 300 (100 + 200)

dieren nodig voor deze experimenten.

3. Modulatie van mPFC connectiviteit vanuit andere hersengebieden:
Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in projectiegebieden naar de mPFC, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Met elektrofysiologisch technieken in plakjes van de PFC kunnen we de connectiviteit tussen enkele cellen meten en tegelijkertijd met licht de inputs naar de PFC activeren. Hierbij kijken we connectiviteit en intrinsieke cel eigenschappen. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we de effecten onderzoeken van verschillende inputs naar de mPFC op connecties tussen cellen binnen dezelfde laag (4 groepen)als op connecties tussen lagen (10 groepen) vanuit 5 verschillende input gebieden. In totaal zijn er dus (14 connecties *5 inputs *10 n=700 dieren) nodig voor deze experimenten.

4. Modulatie van mPFC plasticiteit vanuit andere hersengebieden:
Voor dit onderdeel gebruiken we muizen waarbij opsins of DREADDs tot expressie komen in projectiegebieden naar de mPFC, eigen fok of aangekocht. Zowel mannetjes als vrouwtjes zullen worden gebruikt. Met elektrofysiologisch technieken in plakjes van de PFC kunnen we de plasticiteit van neuronen meten en tegelijkertijd met licht de inputs naar de PFC activeren. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Per groep verwachten we 10 dieren nodig te hebben, geschat op basis van ervaring met vergelijkbare experimenten. Hierbij willen we onderzoeken hoe verschillende inputs naar de mPFC de activiteit van verschillende celtypen kan beïnvloeden. Omdat er veel verschillende typen neuronen zijn willen we een deel van de experimenten doen in muizen die ook fluorescerende markers hebben voor bepaalde cel typen. Voor 5 verschillende input gebieden en 5 verschillende neuron typen hebben we in totaal (5 cel typen *5 inputs *10 n=250 dieren) dieren voor dit onderdeel nodig.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging:
De voorgestelde experimenten kunnen alleen in dieren uitgevoerd worden aangezien het hier gaat om basale kennis verwerving over de structuur van de hersenen. Het gebruik van celkweek, of computermodellen is hiervoor helaas onmogelijk.
Vermindering:
Omdat fysiologisch experimenten veel tijd kosten worden de experimenten op een klein aantal dieren per keer gedaan. Hierdoor is het mogelijk dat de uiteindelijke hoeveelheid dieren lager uitvalt als er meer metingen per dier gedaan kunnen worden.

Verfijning:
We hebben getracht maximale verfijning te bereiken door deze experimenten in hersenplakjes uit te voeren en niet in levende dieren. Verder is het noodzakelijk om het virus te injecteren omdat dit de enige

mogelijkheid is om de activiteit op zo'n specifieke manier te manipuleren. Alle operaties worden gedaan aan de hand van de laatste en beste technieken. Dit verkort de operatie en vermindert de belasting voor de dieren. We gebruiken gangbare technieken zoals recordings in hersenplakjes, dit zorgt er voor dat de dierhandelingen allemaal verfijnd zijn in de loop der jaren (Hamill *et al.*, 1981).

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

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze proeven zijn niet eerder uitgevoerd. Er is weinig bekend over hoe acetylcholine connectiviteit beinvloed. Er zijn publicaties over effecten van acetylcholine op plasticiteit, maar dit is voornamelijk gedaan dmv farmacologische modulatie en niet in alle celtypen die wij willen bestuderen.

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.

Alleen bij dieren waarbij geïnjecteerd wordt is pijnverlichting noodzakelijk. Voor aanvang van de operatie zal er preoperatieve pijnstilling gegeven worden. Dieren worden onder algehele anesthesie gehouden. De hoofdhuid wordt verdoofd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

n.v.t.

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.

- Verlies van lichaamsgewicht: >15% in 24 uur.
- Beweginloosheid: als de rat na herstel van de operatie zich niet kan rondbewegen in zijn thuiskooi wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.
- Abnormale houding: als de muis voor een langdurige periode geen normale houding kan volhouden wordt dat beschouwd als een humaan eindpunt.

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

<3%. De werknemers op dit protocol hebben ruime ervaring in de handelingen en complicaties zijn daardoor zeer zeldzaam.

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.

Handeling	Inschaling	Duur
Decapitatie	Licht	Enkele seconden
Virusinjectie	Matig	2 uur
Anesthesie	Matig	2 uur

Het cumulatieve ongerief is 'matig' voor dieren die virusinjecties krijgen (maximaal 80%), voor de andere dieren is dat licht (minimaal 20%).

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 onderzoek is gericht op fysiologische metingen in hersenplakjes. Doding van het dier voor deze proef is hierdoor noodzakelijk. Het is voor ons onderzoek van belang dat het weefsel in goede staat is, d.w.z. dat zoveel mogelijk neuronen in leven zijn en 'normale' activiteit vertonen. Anesthesie heeft een grote impact op neuronale activiteit en synaptische transmissie en interfereert daarom met de experimenten hier beschreven. Zo heeft anesthesie toxische effecten op het neuronale weefsel en is de plasticiteit, een essentieel van dit onderzoek, niet meer aanwezig bij isoflurane inhalatie(Simon et al., 2001) (Wei et al.,

2002) (Perouansky, 2007). Belangrijke systemen voor ons onderzoek die intact moeten zijn in het hersenweefsel, zijn het glutamaterge en het GABA-erge systeem in de hippocampus en neocortex. Anaesthetica grijpen op GABAA receptoren aan, alsmede op glutamaterge NMDA receptors en andere ionkanaal receptoren. We passen koeling toe op het brein, direct na decapitatie waardoor binnen 30-60 seconden alle elektrische activiteit in het brein stopt.

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.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
Het NVWA nummer is 11200

2. Titel van het project:
De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie

3. Titel van de NTS:
De rol van de frontale cortex in aandacht en impulsiviteit

4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted]
   - e-mailadres contactpersoon: [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   - ☐ ontvangen door DEC: *15-06-2017*
   - ☐ aanvraag compleet: *15-06-2017*
   - ☐ in vergadering besproken: *27-06-2017*
   - ☐ anderszins behandeld: *n.v.t*
   - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: *28-06-2017 t/m 04-07-2017 en 20-07-2017 tot 09-08-2017*
   - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
   - ☐ aanpassing aanvraag: *09-08-2017*
   - ☐ advies aan CCD: *16-8-2017*

7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
-Datum advies IvD: *15-06-2017*
-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: *28-06-2017*
- Strekking gestelde vragen*: 1. Bij de bijlagen moet de keuze voor het geslacht beter onderbouwd worden. 2. In de bijlagen geeft men goede onderbouwing van het onderscheid tussen ventrale en dorsale PFC. Deze onderbouwing graag ook toevoegen in het voorstel zelf. 3. Graag ziet de DEC meer onderbouwing voor de keuze van de verschillende diersoorten. 4. De DEC wil graag weten wat de effecten zijn van een korte isofluraanroes op de resultaten van het onderzoek.*
- Datum antwoord: *04-07-2017*

- Strekking van de antwoord(en): 1. *Er is een referentie toegevoegd en uitgelicht over verschillen in performance in de 5CSRTT tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Ook is er een referentie toegevoegd over verschillen in stress na individueel huisvesten tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. 2. Dit is nu toegevoegd in sectie 3.4.1 van het voorstel. 3. De belangrijkste reden dat we muizen willen gebruiken is dat er meer mogelijkheden zijn voor genetische modificatie. Daarnaast zijn zowel de connecties van en naar de mPFC als binnen de mPFC vergelijkbaar tussen muizen en ratten. 4. In onderdeel L staat nu beschreven dat isofluraan negatieve effecten kan hebben op onze metingen.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

Vraagronde 2
- Datum: *20-07-2017*
- Strekking gestelde vragen*: 1. De NTS moet op een aantal punten worden aangepast zodat het overeenkomt met de rest. 2. Enkele tekstuele opmerkingen bij het projectvoorstel en de bijlagen.*
- Datum antwoord: *09-08-2017*
- Strekking van de antwoord(en): *1. De NTS is aangepast. 2. De opmerkingen zijn verwerkt.*
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja, de antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.*

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 doelcategorie fundamenteel onderzoek is 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.

   Aandacht en concentratie zijn van groot belang om goed te functioneren in het dagelijks leven. Naast psychiatrische aandoeningen als aandachtstekortstoornis (ADD) en aandachtstekort-hyperactiviteitstoornis (ADHD) is aandacht vaak ook aangetast in andere, veel voorkomende ziektes zoals de ziekte van Alzheimer of depressie. We weten dat dieren en mensen slechter aandacht aan specifieke gebeurtenissen in hun omgeving kunnen besteden als de prefrontale cortex minder goed functioneert. De prefrontale cortex (PFC) in onze hersenen zorgt ervoor dat we onze aandacht kunnen vasthouden en relevante informatie uit onze omgeving kunnen filteren in een doelgerichte manier. Ook reguleert de PFC gedrag en emoties, voornamelijk door het inhiberen van ongepaste emoties, impulsen en gewoontes. Het is echter nog niet duidelijk hoe alle verschillende onderdelen met elkaar samenwerken, en welke inkomende en uitgaande informatie van belang is.

   Het directe doel van dit project is inzicht verkrijgen in de rol van de prefrontale cortex (PFC) bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie. Dit zal onderzocht worden door de rol van verschillende populaties projectieneuronen in gedrag te onderzoeken en door het bestuderen van neuronen in hersenplakjes van ratten en muizen. De hypothese is dat verschillende neuronale populaties van de PFC betrokken zijn bij impuls-inhibitie of aandacht, afhankelijk van hun projectiegebied. Het uiteindelijke doel van de studie is om met deze kennis in de toekomst therapieën te ontwikkelen om achteruitgang in aandacht en impulsiviteit tegen te gaan. 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. De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ingrepen ondergaan en omdat de dieren worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De kennis van dit onderzoek kan in de toekomst bijdragen aan het ontwikkelen van betere behandelopties voor patiënten met aandacht en/of impulsproblemen (bv. bij ADD, ADHD, Alzheimer of depressie).

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 betere behandelingsopties voor patiënten met aandacht en/of impulsproblemen. 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:

   De locatie van de dierproef is binnen de instelling van de vergunninghouder. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. 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.

    Tijdens de experimenten 2, 3 en 4 van dierproef 2 worden de dieren individueel gehuisvest, omdat ze kostbare en kwetsbare apparatuur geïmplanteerd hebben gekregen. Uit ervaring is gebleken dat de kans aanwezig is dat de implantaten kapot gaan als dieren samen gehuisvest zijn. Ook tijdens het trainen en testen in de CombiCage zullen de dieren individueel moeten worden gehuisvest, dit omdat deze kooi zo is gemaakt dat er alleen individueel gehuisveste dieren in kunnen worden gehouden. Deze CombiCage zorgt er wel voor dat de dieren in minder tijd (weken tot maanden) de gedragstaak kunnen voltooien.

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.

    Het geschatte ongerief is maximaal matig voor 100% van de dieren. Matig ongerief ontstaat als gevolg van de virusinjectie, het aanbrengen van het implantaat, de individuele huisvesting en door voedselrestrictie. Licht ongerief ontstaat door DREADD injecties en het aansluiten van de dieren voor metingen van neuronale activiteit. Daarnaast zal de anesthesie licht tot matig

ongerief veroorzaken.

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 een implantaatoperatie ondergaan, injecties krijgen en omdat de dieren worden gedood. Daarnaast zal een deel van de dieren individueel worden gehuisvest en is er sprake van voedselrestrictie.

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 de humane eindpunten zijn goed gedefinieerd. De volgende criteria zullen worden gebruikt: Verlies van lichaamsgewicht (> 15% in 24 uur), bewegingsloosheid en een abnormale houding. Daarnaast is het verliezen van het implantaat ook een eindpunt (de kans hierop is <5%). Gebaseerd op eerdere experimenten wordt er rekening gehouden met <3% uitval. Vóórdat meer dan matig ongerief optreedt zullen de humane eindpunten worden toegepast, het totale ongerief is dus maximaal matig.

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.

Het is niet mogelijk de fundamentele kennis over de werking van de prefrontale cortex (PFC) te verkrijgen uit onderzoek met celkweek of de mens. De methodes zoals fMRI en PET hebben niet de resolutie om specifieke hersencellen of kleine groepen cellen bij een levend mens vast te leggen. Dit onderzoek is wel mogelijk bij ratten en muizen, omdat men daar wel alle hersengebieden en cellen kan bereiken.

De keuze voor het gebruik van ratten en muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Ratten zijn beter geschikt voor complex gedragsonderzoek, omdat ze het vermogen hebben om aandachtstaken binnen afzienbare tijd te leren en omdat het rattenbrein grote overeenkomsten heeft met dat van mensen. Muizen zullen gebruikt worden voor experimenten waarbij bepaalde typen cellen worden geactiveerd of geremd. Muizen geven meer mogelijkheden vanwege de beschikbaarheid van verschillende lijnen met genetische modificaties.

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 <u>vermindering</u> van dierproeven.

Door het gefaseerd uitvoeren van de experimenten wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Door de nieuwste technieken te gebruiken is het daarnaast mogelijk meer informatie te verwerven zonder dat er meer proefdieren nodig zijn.

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 1780 ratten en 2090 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.

    De onderzoekers hebben getracht maximale verfijning te bereiken door de experimenten met muizen in hersenplakjes in plaats van in levende dieren uit te voeren. De ratten worden getraind in hun thuiskooi, waardoor de trainingstijd wordt gereduceerd en het stresslevel daalt. Passende anesthesie en pijnbestrijding zal de gevolgen van de ingrepen minimaliseren. Alle procedures zullen uitgevoerd worden door ervaren en bekwaam personeel. Vóórdat meer dan matig ongerief optreedt zullen de humane eindpunten worden toegepast en de dieren worden gedood, zodat het maximale ongerief matig is.

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.

    Voor de experimenten met muizen zal men zowel mannetjes als vrouwtjes gebruiken.

    Echter voor de experimenten met ratten willen de onderzoekers graag alleen mannetjes gebruiken om de volgende redenen: 1. Omdat de gemeten parameters onder invloed kunnen zijn van oestrogenen willen we voorkomen dat de oestrogeencyclus van vrouwen invloed heeft op onze resultaten. 2. De gemeten parameters in de 5CSRTT verschillen voor mannetjes en vrouwtjesratten (Jentsch et al., 2003). 3. Gecombineerde huisvesting van mannelijke en vrouwelijke ratten is niet mogelijk doordat vrouwelijke ratten nadelige effecten hebben op de hanteerbaarheid van de mannelijke ratten. 4. Daarnaast is uit de literatuur bekend dat individuele huisvesting voor vrouwelijke dieren stressvoller is dan voor mannelijke dieren. Gebaseerd op deze resultaten heeft het dus voorkeur om uitsluitend mannelijke ratten te gebruiken vanwege de individuele huisvesting. De DEC is van mening dat het gebruik van één geslacht hiermee goed is verantwoord.

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 de experimenten in ratten is het essentieel om te controleren of het implantaat en de virus expressie zich op de juiste plek bevonden, dit kan alleen door het brein te onderzoeken, en daarom is het noodzakelijk de dieren te doden. Het onderzoek in muizen is gericht op fysiologische metingen in hersenplakjes, doding van het dier door decapitatie zonder voorafgaande anesthesie is hiervoor noodzakelijk. 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 rol van de prefrontale cortex (PFC) bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie het gebruik van maximaal 1780 ratten en 2090 muizen die daarvan 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 maximaal matig ongerief. Dat leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling mb.t. de prefrontale cortex. De waarden die voor de patiënten bevorderd worden: Mogelijk voordeel op de lange termijn wanneer de dierproef bijdraagt aan het ter beschikking komen van betere behandelingsopties voor patiënten met aandacht en/of impulsproblemen.

De DEC is van mening dat de belangen van de onderzoekers en de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 1780 ratten en 2090 muizen, die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Voor het verkrijgen van meer kennis over de functie van de prefrontale cortex 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 kennis verkrijgen over de rol van de prefrontale cortex (PFC) bij cognitieve processen als aandacht en impuls-inhibitie. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van meer kennis en mogelijk betere behandelopties, is afgewogen tegen het, 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 1780 ratten en 2090 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) Het wetenschappelijk belang is substantieel. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan het beschikbaar komen van meer kennis over de rol van de prefrontale cortex bij aandacht en impuls-inhibitie.

(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 wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 1780 ratten en 2090 muizen en het daarbij verwachte 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)*.

Een van de DEC leden heeft bezwaren geuit tegen het onverdoofd decapiteren van de muizen ten behoeve van het fysiologisch onderzoek. Naar zijn mening zijn de gepresenteerde argumenten dat een korte isofluraanroes de resultaten van de metingen zou beïnvloeden onvoldoende overtuigend. Het ongerief (stress) gepaard gaande met een lichte isofluraanroes is naar inschatting vergelijkbaar met de stress en de kortdurende pijn van decapiteren van het hoofd zonder voorafgaande anesthesie. Het decapiteren zonder verdoving heeft echter het inherente risico dat een dier zich onverwacht

verzet precies op het moment dat het guillotinemes wordt gesloten met kans op ernstig ongerief. Het hebben van veel ervaring van het personeel met het toepassen deze methode biedt een zekere garantie dat een dergelijke situatie zich niet zal voordoen. Echter de kans is zeker niet nul en in de leerfase om de benodigde ervaring te verkrijgen is de kans hoger.

Omdat hij van de wetenschappelijke noodzaak voor doden zonder anesthesie onvoldoende overtuigd is, is dit lid van de DEC daarom van mening dat kortdurend isofluraan gebruikt moet worden om de (kleine) kans op ernstig ongerief te voorkomen.

8.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
[redacted]
Van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1120020173124

Bijlagen
2

Datum 23 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 augustus 2017. Het gaat om uw project "De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1120020173124. 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:
23 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

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:
23 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	11200
Naam instelling of organisatie:	Vrije Universiteit Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	53815211
Straat en huisnummer:	De Boelelaan 1105
Postcode en plaats:	1081 HV AMSTERDAM
IBAN:	NL66ABNA0500302480
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	VU Amsterdam

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Naam:	[redacted]
Adres:	Van der Boechhorststraat 1
Postcode en plaats:	1081 BT AMSTERDAM
Wat mag de gemachtigde doen?	[x] Een projectvergunning aanvragen [x] Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen [x] Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning [ ] Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift [ ] Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 januari 2018
Geplande einddatum:	31 december 2022
Titel project:	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie
Titel niet-technische samenvatting:	De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie
Naam DEC:	DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC:	[redacted]
E-mailadres DEC:	[redacted]

Datum:
23 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

Betaalgegevens

De leges bedragen:	€ 1.541,-
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:	Amsterdam
Datum:	23 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
[redacted]
Van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1120020173124

Bijlagen
2

Datum 23 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 23 augustus 2017
Vervaldatum: 22 september 2017
Factuurnummer: 173124

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1120020173124	€ 1.541,00

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.

9.

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: maandag 18 september 2017 14:50
Aan: 'Info-zbo'
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: AVD1120020173124: aanhouden beoordelen

Urgentie: Hoog

Categorieën: Dossier: [redacted]

Geachte CCD,

De antwoorden van de onderzoekers op de onderstaande vragen van de CCD zijn vandaag geupload via de NetFTP verbinding.
Daarnaast hebben de onderzoekers de NTS aangepast, deze is ook naar u verstuurd.

Het gaat hierbij om 2 documenten van: AVD_11200 met de naam: ''antwoorden CCD_AVD1120020173124.pdf'' en '' NTS_prefrontale cortex_final_v2 (14-9).pdf''. Graag vernemen we of u deze documenten in goede orde heeft ontvangen. Mocht er nog meer informatie nodig zijn dan horen we dat graag.

Met vriendelijke groet,
[redacted]

VU VRIJE UNIVERSITEIT AMSTERDAM | HRM, Arbo & Milieu

[redacted] | WERKDAGEN: **ma – do (vr)** |
POSTADRES: van der Boechorststraat 1, 1081 BT Amsterdam |
BEZOEKADRES: van der Boechorststraat 1, 1081 BT Amsterdam | Disclaimer

---

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: woensdag 13 september 2017 11:06
To: [redacted]
Cc: [redacted].
Subject: AVD1120020173124: aanhouden beoordelen

Geachte [redacted]

Op 23 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1120020173124. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- Er vindt in bijlage 3.4.4.2. deprivatie van voedsel plaats om de dieren te motiveren voor de '5-choice serial reaction time task'. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor voedseldeprivatie beter te onderbouwen en hierbij aandacht te besteden aan de complexiteit van de opdrachten, het aantal herhalingen en andere mogelijkheden om dieren te trainen (positieve stimulatie). Ook zijn de mate en duur van de deprivatie en de effecten daarvan op de dieren niet beschreven. U wordt verzocht dit te beschrijven. Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

- In bijlage 3.4.4.3 worden dieren gedood middels decapitatie. Deze methode mag alleen toegepast worden als andere methodes niet mogelijk zijn. U geeft aan dat het toepassen van anesthesie een grote impact heeft op neuronale activiteiten en interfereert met de experimenten beschreven in de aanvraag. Uit het DEC advies blijkt dat een van de DEC leden is van mening is dat de gepresenteerde argumenten niet toereikend zijn, dat het ongerief veroorzaakt door een lichte isofluraanroes naar schatting vergelijkbaar is met de stress en kortdurende pijn van decapitatie, en dat er bij decapitatie zonder verdoving de kans bestaat dat de dieren ernstig ongerief

ondergaan op het moment dat een dier zich verzet als het guillotinemes wordt gesloten. Het desbetreffende DEC lid is daarom van mening dat decapitatie zonder voorafgaande verdoving niet toegestaan zou moeten worden. U wordt verzocht te reageren op het advies van de DEC op dit punt.

- Hoewel u aangeeft dat anesthesie niet mogelijk is, beschrijft u niet waarom cervicale dislocatie niet mogelijk is. U wordt verzocht dit onderbouwen.

- U wordt verzocht het ongerief in de NTS in overeenstemming te brengen met het ongerief in de aanvraag. Niet alle dieren ondergaan matig ongerief.

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

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

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 23 augustus 2017 13:21
Aan: Dessens, D. (d.dessens@vu.nl)
CC: 't.s.heistek@vu.nl'
Onderwerp: OntvangstBevestiging 3124

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

Antwoorden van de onderzoekers op de vragen van de CCD bij aanvraagnummer AVD1120020173124

- Er vindt in bijlage 3.4.4.2. deprivatie van voedsel plaats om de dieren te motiveren voor de '5-choice serial reaction time task'. De onderbouwing hiervoor is niet toereikend. U wordt verzocht de keuze voor voedseldeprivatie beter te onderbouwen en hierbij aandacht te besteden aan de complexiteit van de opdrachten, het aantal herhalingen en andere mogelijkheden om dieren te trainen (positieve stimulatie). Ook zijn de mate en duur van de deprivatie en de effecten daarvan op de dieren niet beschreven. U wordt verzocht dit te beschrijven. Tot slot wordt u verzocht te beschrijven hoe gehandeld wordt als dieren de minimale hoeveelheid water op een dag niet 'verdienen'.

Een standaard methode om proefdieren gemotiveerd te krijgen een doelgerichte taak te laten doen is voedseldeprivatie. Hierbij worden de ratten tot ~85% van hun normale lichaamsgewicht gedepriveerd door ze dagelijks toegang tot een beperkte hoeveelheid voedsel te geven. Dit in tegenstelling tot vrije toegang tot voedsel, waarbij de ratten zoveel kunnen eten als ze willen.

De 5-choice serial reaction time task is een taak die gebaseerd is op doelgericht gedrag van de rat. Om goede wetenschappelijke conclusies op basis van het gedrag van de rat te kunnen trekken moet de rat de taak goed uitvoeren; hij doet genoeg herhalingen van de taak op een goed prestatieniveau. Tijdens het doen van de taak zien wij ook heel duidelijk een verband tussen de hoeveelheid voedselrestrictie en goed de rat te taak doet. Ratten die niet of nauwelijks gewicht zijn afgevallen doen de taak slecht, maar wanneer ze een paar dagen minder voedsel hebben gekregen zien we een grote verbetering in de prestatie in de taak. De ratten krijgen ongeveer, afhankelijk van de duur van het experiment, tussen de 1 en 2 maanden beperkt toegang tot voer. De totale hoeveelheid voer per dag blijft relatief constant en bestaat uit een combinatie van voer verdiend in het experiment as wel extra toegediend voer.

Het geven van voedsel in de gedragstaak is een positieve beloning. Wanneer een rat vrij toegang heeft tot voedsel is de beloning per verdiende voedsel pellet in de taak lager dan wanneer er voedseldeprivatie plaats vindt.

Ook is in de literatuur beschreven dat vrije toegang tot voedsel voor ratten kan leiden tot ziekteverschijnselen zoals diabetes en kanker. In ratten die beperkte toegang hebben tot voedsel zien we deze ziektebeelden aanzienlijk minder en kunnen als gezondere beesten beschouwd worden.

De ratten behouden vrij toegang tot water.

- In bijlage 3.4.4.3 worden dieren gedood middels decapitatie. Deze methode mag alleen toegepast worden als andere methodes niet mogelijk zijn. U geeft aan dat het toepassen van anesthesie een grote impact heeft op neuronale activiteiten en interfereert met de experimenten beschreven in de aanvraag. Uit het DEC advies blijkt dat een van de DEC leden is van mening is dat de gepresenteerde argumenten niet toereikend zijn, dat het ongerief veroorzaakt door een lichte isofluraanroes naar schatting vergelijkbaar is met de stress en kortdurende pijn van decapitatie, en dat er bij decapitatie zonder verdoving de kans bestaat dat

de dieren ernstig ongerief ondergaan op het moment dat een dier zich verzet als het guillotinemes wordt gesloten. Het desbetreffende DEC lid is daarom van mening dat decapitatie zonder voorafgaande verdoving niet toegestaan zou moeten worden. U wordt verzocht te reageren op het advies van de DEC op dit punt.

In ons lab wordt decapitatie zonder verdoving al jaren toegepast. Hier is het nog nooit voorgekomen dat een dier extra ongerief heeft gehad. Als het dier goed gefixeerd is dan is het niet mogelijk dat het dier zich terugtrekt op moment van decapitatie. Aangezien het ongerief vergelijkbaar is met isofluraan roes en isofluraan mogelijk invloed heeft op de metingen zijn wij van mening dat decapitatie de beste methode is.

- Hoewel u aangeeft dat anesthesie niet mogelijk is, beschrijft u niet waarom cervicale dislocatie niet mogelijk is. U wordt verzocht dit onderbouwen.

Bij het vrij prepareren van het brein is het belangrijk dat dit zo snel mogelijk gebeurd, aangezien het weefsel in leven moet blijven. Cervicale dislocatie is een extra handeling waardoor het langer duurt aangezien het dier daarna alsnog gedecapiteerd moet worden. Daarnaast is er de mogelijkheid dat cervicale dislocatie mechanische schade aanbrengt aan het brein. Er is ook een mogelijkheid dat de cervicale dislocatie niet afdoende wordt uitgevoerd en het dier extra ongerief heeft.

- U wordt verzocht het ongerief in de NTS in overeenstemming te brengen met het ongerief in de aanvraag. Niet alle dieren ondergaan matig ongerief.

Het ongerief in de NTS is aangepast

11.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Amsterdam
[redacted]
Van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1120020173124
Bijlagen
1

Datum 19 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 23 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie" met aanvraagnummer AVD1120020173124. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 18 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 13 september 2017 hebben wij u vragen gesteld over deprivatie, decapitatie en NTS. 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 "De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

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

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

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

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

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

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

Centrale Comm[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:	Vrije Universiteit Amsterdam
Adres:	De Boelelaan 1105
Postcode en plaats:	1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer:	11200

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "De rol van de frontale cortex in aandacht en impuls-inhibitie" met aanvraagnummer AVD1120020173124, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 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 18 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 augustus 2017, ontvangen op 23 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 18 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Rat anatomische en fysiologische studies				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	500	100% Matig	
3.4.4.2. Rat gedrag				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	1.280	100% Matig	
3.4.4.3. Muis fysiologische studies				
	Muizen (Mus musculus) /	2.090	80% Matig 20% Licht	

Aanvraagnummer:
AVD1120020173124

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:
AVD1120020173124

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.

3165

1.

29 AUG. 2017

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

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

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

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

Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9

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

Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 29
Postbus	9101, t.a.v. CDL, [redacted]
Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
IBAN	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[redacted] ☐ Dhr. ☑ Mw.
Functie	UHD
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	[redacted] ☐ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	Instantievoor Dierenwelzijn
		Afdeling	[redacted]
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
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	25-09-2017
		Einddatum	01-04-2020
3.2	Wat is de titel van het project?	Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotiona	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Morfine-gerelateerde emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	RU DEC
		Postadres	Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [redacted]
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

- [x] Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00 Lege
- [ ] Wijziging € Lege

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

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

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

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

Overige bijlagen, indien van toepassing

- [ ] Melding Machtiging
- [x] DEC-advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	25-08-2017
Handtekening	[redacted]

2.

Form
Project proposal

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

[X] Basic Research
[] Translational or applied research
[] Regulatory use of routine production
[] Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
[] Research aimed at preserving the species subjected to procedures

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Summary:

In this project we will focus for the first time on the ventral hippocampal mechanisms associated with morphine-induced associative and emotional memory. We hypothesize that morphine as a stimulus inducing emotional state could entail changes in ventral hippocampal neuroplasticity. To look into these issues, we examined how morphine-induced contextual memory affects neural activity of the ventral hippocampus. For this, long-term potentiation (LTP) as a compelling model for studying the synaptic changes in the strength of interneuronal connections will analyzed and it will be based on the changes in amplitude and slope of excitatory post synaptic responses (EPSP). Furthermore, the effect of morphine-induced conditioned place preference on epigenetic modification of genes, DNA methylation, in the ventral hippocampus will studied.

A small number of drugs and chemical agents can come to control human behavior by producing a state called addiction (Hyman, Malenka, & Nestler, 2006). Addiction is a complex disease process of the brain that results from recurring drug intoxication and is modulated by genetic, developmental, and environmental factors (Goldstein & Volkow, 2002). The goals of the addicted person become narrowed to obtaining, using, and recovering from drugs, despite failure in life roles, medical illness, risk of incarceration, and other problems. An important characteristic of addiction is its stubborn persistence (Hser, Hoffman, Grella, & Anglin, 2001; McLellan, Lewis, O'brien, & Kleber, 2000). Opiates such as morphine are among the most widely consumed drug of abuse (Pouletty, 2002). Morphine currently serves as the most effective pain reliever and is frequently prescribed for moderate to

severe pain, but the clinical utility of morphine can often alter the central pain related systems and is hampered by the development of tolerance, decreased analgesic effect of the drugs, and physical and even psychological dependence, a behavioral state requiring continued dose to avoid a series of aversive withdrawal syndromes following the long-term usage of the drugs (O'brien, 1997). Drug addiction can be understood as a pathological subversion of normal brain learning and memory processes strengthened by the motivational impact of drug associated stimuli, leading to the establishment of compulsive drug-seeking habits. Such habits evolve through a cascade of complex associative processes with Pavlovian and instrumental components that may depend on the integration and coordination of output from several somewhat independent neural systems of learning and memory, each contributing to behavioral performance (Robbins & Everitt, 2002). Recently, the molecular pathways of learning and memory on the one hand, and of drug addiction on the other, have converged. They are accompanied by alterations in neural plasticity at glutamatergic synapses (Jones, Kornblum, & Kauer, 2000; Nicola, Surmeier, & Malenka, 2000). Learning and memory are thought to be encoded by changes in the usage of interneuronal connections. In other words, synapses that experience frequent use will be strengthened, whereas those that receive less use are weakened. In this way, an experience (which results in activation of pathways and increased synaptic "use") may produce a long-lasting enhancement of communication between neurons in those pathways (resulting in a memory). Long-term potentiation (LTP) has been the most compelling model for studying the synaptic basis of use-dependent changes in the strength of interneuronal connections. In LTP, brief repetitive activation of excitatory glutamate-containing pathways (produced by high frequency stimulation, or tetanus) leads to an increase in the strength of glutamate synapses that lasts many hours in brain slices and even for weeks in intact animals (Bliss & Lømo, 1973; Fonseca, Nägerl, Morris, & Bonhoeffer, 2004). Drugs of abuse modify LTP in different areas of the mesocorticolimbic system, one of the major substrates of drugs of abuse (Everitt et al., 2008; Mameli et al., 2009). Drug-induced alterations in LTP have been proposed to be important factors leading to compulsive drug intake that they would facilitate by rendering drug taking impermeable to changes (Kauer & Malenka, 2007). LTP was first demonstrated in the hippocampus, which was part of the reason that LTP was speculated to underlie memory formation (Bliss, Collingridge, & Morris, 2003).

The hippocampus is a brain region associated with learning and memory (Everitt & Robbins, 1997). The rodent hippocampus consists of at least two distinguishable parts, dorsal and ventral, based on the neural connection with the cortex and subcortical nuclei (Maruki, Izaki, Nomura, & Yamauchi, 2001). Regional differences between the dorsal and ventral regions with respect to neurochemical and neurophysiological properties have also been reported (Izaki, Takita, & Nomura, 2000; Papatheodoropoulos & Kostopoulos, 2000). The dorsal hippocampus is particularly important for spatial memory (Moser, Moser, Forrest, Andersen, & Morris, 1995) whereas the ventral portion is involved in associative memory and emotional memory (Sahay & Hen, 2007). Emotional memory is a special category of memory involving the implicit (unconscious) learning and storage of information about the emotional significance of events (LeDoux, 1993). The conditioned place preference (CPP) animal model has been used extensively in

addiction research to study emotional memory and context-mediated drug reward and its extinction (Tzschentke, 1998). In this model, the animal learns to associate an environmental context with opiate reward. Particularly, drug administration is paired with one context, while saline administration is paired with another context. CPP develops when an animal spends more time in the chamber associated with a drug of abuse than in the chamber associated with saline (Bardo & Bevins, 2000).

The hippocampus has three well-studied synaptic pathways: first, the perforant pathway which synapses onto the granule cells in the dentate gyms; second, the granule cells which send axons (the mossy fibers) that synapse on the pyramidal cells in the CA3 region of the hippocampus; and third, the pyramidal cells in CA3 which send excitatory (Schaeffer) collaterals to the pyramidal neurons in the CA1 region of the hippocampus. Each of these three major synaptic pathways can undergo LTP, but the potentiation has different properties and perhaps a different mechanism at different sites (Brown, Kairiss, & Keenan, 1990; Zalutsky & Nicoll, 1990). In the CA1 region and the dentate gyrus, LTP has Hebbian characteristics (Brown et al., 1990), its induction requiring coincident activity in the post synaptic pyramidal neuron and presynaptic neurons. This Hebbian feature endows LTP in CA1 with a property called associativity. When weak stimulation of one input pathway (which is itself insufficient to produce LTP) is temporally paired (or associated with) strong stimulation of another input pathway (capable of producing LTP), the weak pathway also undergoes LTP. By contrast, LTP in the CA3 region is not Hebbian, and it is not associative (Chattarji, Stanton, & Sejnowski, 1989). The Hebbian characteristics of LTP in the CA1 region result from the fact that LTP only occurs if the postsynaptic cell is active (depolarized) in coincidence with the presynaptic input. Conversely, depolarization of the postsynaptic cell by intracellular current injection can induce LTP when it is paired with weak presynaptic stimulation. Maximal LTP occurs when activation of the presynaptic and postsynaptic cells is nearly simultaneous (Siegelbaum & Kandel, 1991). Accumulating evidence demonstrates that the hippocampus plays a role in opioid dependence (Rezayof, Zarrindast, Sahraei, & Haeri-Rohani, 2003). The involvement of opioids in LTP the lateral perforant path–dentate granule cell synapses has been reported (Breindl, Derrick, Rodriguez, & Martinez, 1994; Xie & Lewis, 1991). Several studies have shown that chronic exposure to morphine or heroin leads to the impairment of hippocampal LTP (Bao et al., 2007; Salmanzadeh, Fathollahi, Semnanian, & Shafizadeh, 2003) and induces cognitive deficits, as shown by poor performances on memory tasks of chronic opiate treated rodents (Gorji, Rashidy-Pour, & Fathollahi, 2008; Pu, Bao, Xu, Ma, & Pei, 2002). Furthermore, Derrick and Martinez showed the involvement of opioids in mossy fiber LTP induction. Finally, Stringer et al (Derrick & Martinez, 1994) reported that morphine had no effect on the magnitude of LTP in the CA1 region of hippocampal slices, but attenuated LTP in vivo (Fakira et al., 2014; Wen et al., 2014). It was found that LTP was slightly impaired in naïve prenatal morphine exposure rats (Tan et al., 2015). In other research it was shown that acute in-vivo morphine administration induces the long-term potentiation (Mor-LTP) of field excitatory postsynaptic potentials at the prefrontal cortex-to-

nucleus accumbens shell synapses (Zheng et al., 2014). Hence, in vivo measurement of LTP is essential to understand the physiological changes underlying morphine-related emotional memories.

It is suggested that drug-induced neural plasticity drives long-term behavioral abnormalities through changes in gene expression in brain reward regions (Chao & Nestler, 2004; Nestler, 2004). However, the molecular mechanisms underlying drug-induced alterations in gene expression are still unknown. Accumulating evidence has demonstrated that epigenetic modifications, including histone acetylation and DNA methylation, play an important role in gene regulation induced by addictive drugs (Tsytsykova et al., 2007). DNA methylation occurs by transfer of a methyl group from S-adenosyl methionine (SAM), a universal methyl group donor in biochemical reactions in cells, to cytosine residues at the dinucleotide sequence CpG, and is catalyzed by DNA methytransferases (DNMTs) (Tsankova, Renthal, Kumar, & Nestler, 2007). Recent results have indicated associations between the status of DNA methylation in the promoter region of several genes and drug addiction. For example, DNA hypermethylation in the Oprm1 promoter region was demonstrated in lymphocytes of former methadone-maintained heroin addicts (Nielsen et al., 2009). It was found that acute and repeated cocaine treatments resulted in DNA hypermethylation and transcriptional downregulation of the protein phosphatase1 catalytic subunit (Pp1c) gene, and hypomethylation and transcriptional activation of FosB gene in the NAc (Anier, Malinovskaja, Aonurm-Helm, Zharkovsky, & Kalda, 2010). Upregulation of DNA methyltransferase 3a and 3b and global DNA hypomethylation were observed in the nucleus accumbens core (Nac) of cocaine-pretreated rats (Wright et al., 2015). Higher DNA methylation associated with chronic opioid exposure was reproduced in an independent cohort of opioid-treated as compared to non-opioid-treated pain patients. This suggests that opioids may stimulate DNA methylation (Doehring et al., 2013; Trivedi et al., 2014). In opiate users, increased methylation of 2 CpG dinucleotides in the μ-opioid receptor gene (*OPRM1*) promoter region has been demonstrated (Ebrahimi et al., 2017). However, there has been no investigation so far to detect the global status of DNA methylation in the ventral hippocampus after exposure to morphine induced conditioned place preference.

Glossary for terms used throughout the application: CPP:
Conditioned Place Preference
LTP: Long Term Potentiation
SAM: S-adenosyl methionine

References:
Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2010). DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology, 35*(12), 2450-2461.
Bao, G., Kang, L., Li, H., Li, Y., Pu, L., Xia, P., . . . Pei, G. (2007). Morphine and heroin differentially modulate in vivo hippocampal LTP in opiatedependent rat. *Neuropsychopharmacology, 32*(8), 1738-1749.

Bardo, M., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology, 153*(1), 31-43.
Bliss, T. V., Collingridge, G. L., & Morris, R. G. (2003). Introduction. Long-term potentiation and structure of the issue. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 358*(1432), 607.
Bliss, T. V., & Lømo, T. (1973). Long□lastingpotentiationof synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *The Journal of physiology, 232*(2), 331-356.
Breindl, A., Derrick, B. E., Rodriguez, S. B., & Martinez, J. L. (1994). Opioid receptor-dependent long-term potentiation at the lateral perforant pathCA3 synapse in rat hippocampus. *Brain research bulletin, 33*(1), 17-24.
Brown, T. H., Kairiss, E. W., & Keenan, C. L. (1990). Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. *Annual review of neuroscience, 13* (1), 475-511.
Chao, J., & Nestler, E. J. (2004). Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu. Rev. Med., 55*, 113-132.
Chattarji, S., Stanton, P. K., & Sejnowski, T. J. (1989). Commissural synapses, but not mossy fiber synapses, in hippocampal field CA3 exhibit associative long-term potentiation and depression. *Brain research, 495*(1), 145-150.
Derrick, B., & Martinez, J. (1994). Opioid receptor activation is one factor underlying the frequency dependence of mossy fiber LTP induction. *Journal of Neuroscience, 14*(7), 4359-4367.
Doehring A, Oertel BG, Sittl R, Lötsch J (2013) Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. PAIN® 154:15-23.
Ebrahimi G, Asadikaram G, Akbari H, Nematollahi MH, Abolhassani M, Shahabinejad G, Khodadadnejad L, Hashemi M (2017) Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter region in men with opioid use disorder. The American journal of drug and alcohol abuse:1-7.
Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363*(1507), 3125-3135.
Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. *Annual review of psychology, 48*(1), 649-684.
Fakira AK, Portugal GS, Carusillo B, Melyan Z, Morón JA (2014) Increased SK2 channel-mediated negative feedback on NMDAR impairs synaptic plasticity following context-dependent sensitization to morphine. Biological psychiatry 75:105.
Fonseca, R., Nägerl, U. V., Morris, R. G., & Bonhoeffer, T. (2004). Competing for memory: hippocampal LTP under regimes of reduced protein synthesis. *Neuron, 44*(6), 1011-1020.
Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry, 159*(10), 1642-1652.
Gorji, H. M., Rashidy-Pour, A., & Fathollahi, Y. (2008). Effects of morphine dependence on the performance of rats in reference and working versions of the water maze. *Physiology & behavior, 93*(3), 622-627.
Hser, Y.-i., Hoffman, V., Grella, C. E., & Anglin, M. D. (2001). A 33-year follow-up of narcotics addicts. *Archives of general psychiatry, 58*(5), 503508.
Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci., 29*, 565-598.
Izaki, Y., Takita, M., & Nomura, M. (2000). Comparative induction of long-term depression between dorsal and ventral hippocampal CA1 in the anesthetized rat. *Neuroscience letters, 294*(3), 171-174.
Jones, S., Kornblum, J. L., & Kauer, J. A. (2000). Amphetamine blocks long-term synaptic depression in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience, 20*(15), 5575-5580.
Kauer, J. A., & Malenka, R. C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nature reviews neuroscience, 8*(11), 844-858.

LeDoux, J. E. (1993). Emotional memory systems in the brain. *Behavioural brain research, 58*(1), 69-79.
Mameli, M., Halbout, B., Creton, C., Engblom, D., Parkitna, J. R., Spanagel, R., & Lüscher, C. (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nature neuroscience, 12*(8), 1036-1041.
Maruki, K., Izaki, Y., Nomura, M., & Yamauchi, T. (2001). Differences in paired□pulsefacilitation and long□termpotentiation between dorsal and ventral CA1 regions in anesthetized rats. *Hippocampus, 11*(6), 655-661.
McLellan, A. T., Lewis, D. C., O'brien, C. P., & Kleber, H. D. (2000). Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama, 284*(13), 1689-1695.
Moser, M.-B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 92*(21), 9697-9701.
Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology, 47*, 24-32.
Nicola, S. M., Surmeier, D. J., & Malenka, R. C. (2000). Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Annual review of neuroscience, 23*(1), 185-215.
Nielsen, D. A., Yuferov, V., Hamon, S., Jackson, C., Ho, A., Ott, J., & Kreek, M. J. (2009). Increased OPRM1 DNA methylation in lymphocytes of methadone-maintained former heroin addicts. *Neuropsychopharmacology, 34*(4), 867-873.
O'brien, C. P. (1997). A range of research-based pharmacotherapies for addiction. *Science, 278*(5335), 66-70.
Papatheodoropoulos, C., & Kostopoulos, G. (2000). Dorsal-ventral differentiation of short-term synaptic plasticity in rat CA1 hippocampal region. *Neuroscience letters, 286*(1), 57-60.
Pouletty, P. (2002). Drug addictions: towards socially accepted and medically treatable diseases. *Nature Reviews Drug Discovery, 1*(9), 731-736. Pu, L., Bao, G.-B., Xu, N.-J., Ma, L., & Pei, G. (2002). Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *Journal of Neuroscience, 22*(5), 1914-1921.
Rezayof, A., Zarrindast, M.-R., Sahraei, H., & Haeri-Rohani, A. (2003). Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *Journal of psychopharmacology, 17*(4), 415-423.
Robbins, T. W., & Everitt, B. (2002). Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiology of learning and memory, 78*(3), 625-636.
Sahay, A., & Hen, R. (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature neuroscience, 10*(9), 1110-1115.
Salmanzadeh, F., Fathollahi, Y., Semnanian, S., & Shafizadeh, M. (2003). Dependence on morphine impairs the induction of long-term potentiation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain research, 965*(1), 108-113.
Siegelbaum, S. A., & Kandel, E. R. (1991). Learning-related synaptic plasticity: LTP and LTD. *Current opinion in neurobiology, 1*(1), 113-120.
Stringer, J. L., Greenfield, L. J., Hackett, J. T., & Guyenet, P. G. (1983). Blockade of long-term potentiation by phencyclidine and σ opiates in the hippocampus in vivo and in vitro. *Brain research, 280*(1), 127-138.
Tan JW, Duan TT, Zhou QX, Ding ZY, Jing L, Cao J, Wang LP, Mao RR, Xu L (2015) Impaired contextual fear extinction and hippocampal synaptic plasticity in adult rats induced by prenatal morphine exposure. Addiction biology 20:652-662.
Trivedi M, Shah J, Hodgson N, Byun H-M, Deth R (2014) Morphine Induces Redox-Based Changes in Global DNA Methylation and Retrotransposon Transcription by Inhibition of Excitatory Amino Acid Transporter Type 3–Mediated Cysteine Uptake. Molecular pharmacology 85:747-757.
Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., & Nestler, E. J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature reviews neuroscience, 8*(5), 355367.
Tsytsykova, A. V., Falvo, J. V., Schmidt-Supprian, M., Courtois, G., Thanos, D., & Goldfeld, A. E. (2007). Post-induction, stimulus-specific regulation of tumor necrosis factor mRNA expression. *Journal of Biological Chemistry, 282*(16), 11629-11638.
Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in neurobiology, 56*(6), 613-672.

Wen D, Zang G, Sun D, Yu F, Mei D, Ma C, Cong B (2014) Cholecystokinin-octapeptide restored morphine-induced hippocampal long-term potentiation impairment in rats. Neuroscience letters 559:76-81.
Wright KN, Hollis F, Duclot F, Dossat AM, Strong CE, Francis TC, Mercer R, Feng J, Dietz DM, Lobo MK (2015) Methyl supplementation attenuates cocaine-seeking behaviors and cocaine-induced c-Fos activation in a DNA methylation-dependent manner. Journal of Neuroscience 35:8948-8958.
Xie, C.-W., & Lewis, D. V. (1991). Opioid-mediated facilitation of long-term potentiation at the lateral perforant path-dentate granule cell synapse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 256*(1), 289-296.
Zalutsky, R. A., & Nicoll, R. A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science, 248*(4963), 16191625.
Zheng Q, Liu Z, Wei C, Han J, Liu Y, Zhang X, Ren W (2014) Activation of the D1 receptors inhibits the long-term potentiation in vivo induced by acute morphine administration through a D1–GluN2A interaction in the nucleus accumbens. Neuroreport 25:1191-1197.

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?

To advance the understanding of the role of the ventral hippocampus in morphine addiction and how synaptic plasticity and epigenetic modification contribute to morphine-induced emotional memories, we aim to test the hypothesis that the formation of morphine-related emotional memory is due to morphine-induced changes in neuronal plasticity and epigenetic modifications in the ventral hippocampus.

Objectives:
- In the first experiment we would like to investigate whether morphine induced CPP is associated with changes in LTP induction in the ventral hippocampus of rats.
- In the second experiment we would like to establish whether morphine induced CPP is associated with changes in global DNA methylation in the ventral hippocampus of rats.

Feasibility:
Our lab has the needed experience and facilities in-house to perform address these objectives. Our group has strong expertise in behavioral studies such as CPP (Homberg et al., 2008). I have expertise with in vivo electrophysiology, obtained at Tarbiat modares university, Tehran and Drug applied research center, Tabriz, Iran (Sadighi et al., 2013).
Reference:
Homberg, Judith R., et al. "Adaptations in pre-and postsynaptic 5-HT1A receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats." *Psychopharmacology* 200.3 (2008): 367-380.
Sadighi, Mina, et al. "Effect of low frequency electrical stimulation on spike and wave discharges of perioral somatosensory cortex in WAG/Rij rats." *Pathophysiology* 20.3 (2013): 171-176.

3.3 Relevance

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

According to the World Health Organization, drug addiction is ranked within the Top 10 of most burdensome disorders and costs the society 179 billion Euros annually (Olesen et al. 2012). Basic understanding of mechanisms underlying drug addiction can ultimately be back-translated into treatment adjustments in follow-up studies, and potentially prevention approaches. This is essential, because there is no satisfying pharmacotherapy available for the treatment of drug addiction. On the long-term, this research can facilitate the development of novel treatments for opiate addicts, such as the application of plasticity modifying agents.

The main goal of this research is about long lasting changes in the ventral hippocampus following morphine-associated-context memory. The findings of this project could provide novel insight into the mechanism by which morphine, and potentially other opioids, can influence on addiction-related plastic alterations and as a results drug seeking behavior and drug relapse. Since epigenetic and neural activity changes are implicated in drug addiction, this study could serve as a useful resource for investigators to explore a novel mechanism of action for other drugs of abuse.

References

Olesen, J., A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen, B. Jonsson, C. s. group and C. European Brain (2012). "The economic cost of brain disorders in Europe." Eur J Neurol 19(1): 155-162.

3.4 Research Strategy

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

To analyse whether emotional memory related to morphine abuse is associated with long lasting changes hippocampus, we need to study the neural activity and epigenetic changes after morphine in the brains of rats exposed to drug and CPP. To induce morphine-dependent emotional memory we use the conditioned place preference (CPP) test. In this test the emotional effects induced by the drug, in our case morphine, is associated with contextual information of the chamber in which the animals are placed immediately after a morphine injection. This is a well validated method to measure drug-related emotional memories (Prus et al., 2009). We use rats because they are the best animal model to perform behavioral studies to investigate addiction disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use less complex animals.
To measure LTP in the hippocampus in freely moving animals we will stereotactically implant electrodes into the ventral hippocampus of rats. After behavioural testing we will record how neuronal activity and synaptic plasticity in the ventral hippocampus have changed.
To measure epigenetic modifications associated with morphine-induced emotional memory we sacrifice the animals after CPP testing to harvest the ventral hippocampus.

Separate groups of animals are needed for the in vivo electrophysiology and ex vivo epigenetic measures, as the first requires a surgery (that could induce epigenetic changes) and perfusion in order to verify the placement of the electrode, and the latter requires freshly frozen brain tissue.

Reference:
Prus, Adam J., John R. James, and John A. Rosecrans. "Conditioned place preference." (2009).

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.

1. Experiment 1 (morphine induced conditioned place preference and electrophysiology recording)

Adult male wild type rats will undergo a stereotaxic surgery to implant electrodes in the brain. The rats will then be allowed to recover for one week. After recovery, the animals are tested in the three-compartment test cage. During the pre-test of 15 min the animals are allowed to freely explore the test cage. Then conditioning starts, during which the animals will receive subcutaneous injection of 10 mg/kg morphine immediately prior to placement in one compartment and saline in the other compartment, on alternating days. After 4 morphine and 4 saline conditioning sessions of 40 min the animals are again allowed to freely explore the test cage (post-test). The retrieval of the conditioned place memory is measured by subtracting the time the animals spent in the morphine-conditioned chamber during the pre-test from the post-test (analysed using Ethovision 3.1 software (Noldus Information Technology). Conditioned place preference (CPP) is present if the animals spend significantly more time in the drug-paired compartment versus the vehicle-paired compartment. The ability of a stimulus, such as morphine, to produce a preference for the associated environment is generally considered to be a process driven by Pavlovian conditioning. After CPP testing, animals will be put into a cage to record hippocampus field potentials. Then animals are anesthetized and their brains are removed for histological verification of electrode placement. NB: several control groups are included: CPP testing without drug (to test whether expose to the CPP alone has effects on plasticity), and single and repeated saline and morphine injections (to test whether it is not the drug effect itself (single or repeated), but the drug-induced emotional memory that is associated with changes in plasticity). See table below. Our unpublished data reveal substantial differences between these experimental groups (Sadighi et al., under revision at Addiction Biology), indicating that these controls are essential for the proper interpretation of the findings. The paper can be provided on request.

2. Experiment 2 (morphine induced conditioned place preference and DNA methylation study)

A new group of rats will be used. After CCP testing as mentioned above or injecting the rats with morphine and saline without CPP testing, the animals will anestethized and brains will be removed. Then the ventral hippocampus will bilaterally dissected and will be prepared to measure global DNA methylation.

The animal groups in experiment 1 and 2 will be as follows:

Group	Treatment	Experiment	Role
Morphine_CPP	Morphine/saline injection for CPP	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Morphine induced CPP
Saline-CPP	saline injection for CPP (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Morphine induced CPP
CPP without injection	CPP (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	CPP
Single morphine injection	Morphine injection	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	One time drug injection effect
Single saline injection	Saline injection (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	One time vehicle injection effect
Repeated morphine injection	Morphine injection	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Repeated drug injection effect
Repeated saline injection	Saline injection (control)	stereotaxic surgery (1); brain tissue collection (2)	Repeated vehicle injection effect

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

This study aims to investigate the synaptic plasticity and epigenetic modifications related to morphine addiction. This study involves two experiments, which are independent from each other: investigation of LTP (exp 1) and global DNA methylation (exp 2) in association with morphine-induced emotional memory. The experiments together address this aim. For this reason, addictive behavior of the morphine induced conditioned rats will be assessed first, followed by the measurement of either the associated neural activity or epigenetic modifications in the ventral hippocampus.

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	Behaviour

3.

Format
Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Morfine-gerelateerde emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus
1.2	Looptijd van het project	25-9-2017 - 1-4-2020
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Morfine, geheugen, synaptische plasticiteit, ventrale hippocampus, ratten

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

[X] 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 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Drugsverslaving gaat gepaard met veel ongerief voor patiënten en heeft grote financiële impact op de maatschappij. Methoden om drugsverslaving te behandelen zijn op dit moment nog niet goed genoeg. De reden is dat drugsverslaving nog onvoldoende wordt begrepen. Drugsverslaving is onder andere het gevolg van een te sterk geheugen voor de omgeving waar drug effecten worden ervaren. De vorming van dit geheugen hangt af van neurale plasticiteit in de hippocampus, maar de precieze mechanismen zijn nog niet opgehelderd. Wij willen in dit project deze mechanismen op helderen.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	Dit onderzoek zal inzicht geven in de veranderingen in de aanpassingen in de hippocampus (een specifiek hersengebied) die een rol spelen bij geheugen in drugsverslaving. Geheugen voor de omgeving waar de effecten van drugs worden ervaren is een sterke drijfveer voor het in stand houden van drugsverslaving. De resultaten van ons onderzoek kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van interventies die dit geheugen kunnen afzwakken, waardoor een drugsverslaving in de toekomst mogelijk beter behandeld kan worden.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Er worden 168 ratten gebruikt
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De dieren krijgen subcutane morfine injecties en worden in een nieuwe box gezet; deze handelingen gaan gepaard met stress. De ratten zullen ook een hersenoperatie ondergaan. Het bijkomen uit de narcose en het herstel na de operatie gaat ook gepaard met stress en ongerief.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Licht voor 50% (niet-geopereerde dieren) Matig voor 50% van de dieren
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden tijdens of na het onderzoek gedood. De hersenen van de dieren worden gebruikt om de plaatsing van de electrode te controleren of om hersenweefsel te verzamelen voor verder onderzoek.

4 Drie V’s

4.1	**Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	De rat is het beste diermodel om drugsverslaving te onderzoeken. Het meeste verslavingsonderzoek is gedaan met ratten, wat vergelijkingsmateriaal oplevert voor de huidige studies. Gezien de complexiteit van het gedrag kan het onderzoek niet in minder complexe diersoorten uitgevoerd worden. We maken gebruik van de rat, en niet de mens, omdat het bestuderen van verbinding tussen hersengebieden technieken vereist die niet toepasbaar zijn bij de mens.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal aangevraagde dieren is het minimale dat nodig is voor wetenschappelijk betrouwbare uitspraken.
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 dieren zijn verdoofd tijdens de operaties. Voor en na de operatie krijgen de ratten pijnstilling. Na de operatie krijgen de dieren ook een antibiotica behandeling. De dieren krijgen alternatieve kooiverrijking, waardoor beschadiging van de aangebrachte elektrode wordt voorkomen.
4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Om stress na de operatie te verminderen worden de dieren sociaal gehuisvest. Wanneer een dier meer ongerief heeft dan toegestaan voor dit project dan zal het op humane wijze worden gedood.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	

4.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

		Serial number	Type of animal procedure
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	1	Behaviour

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

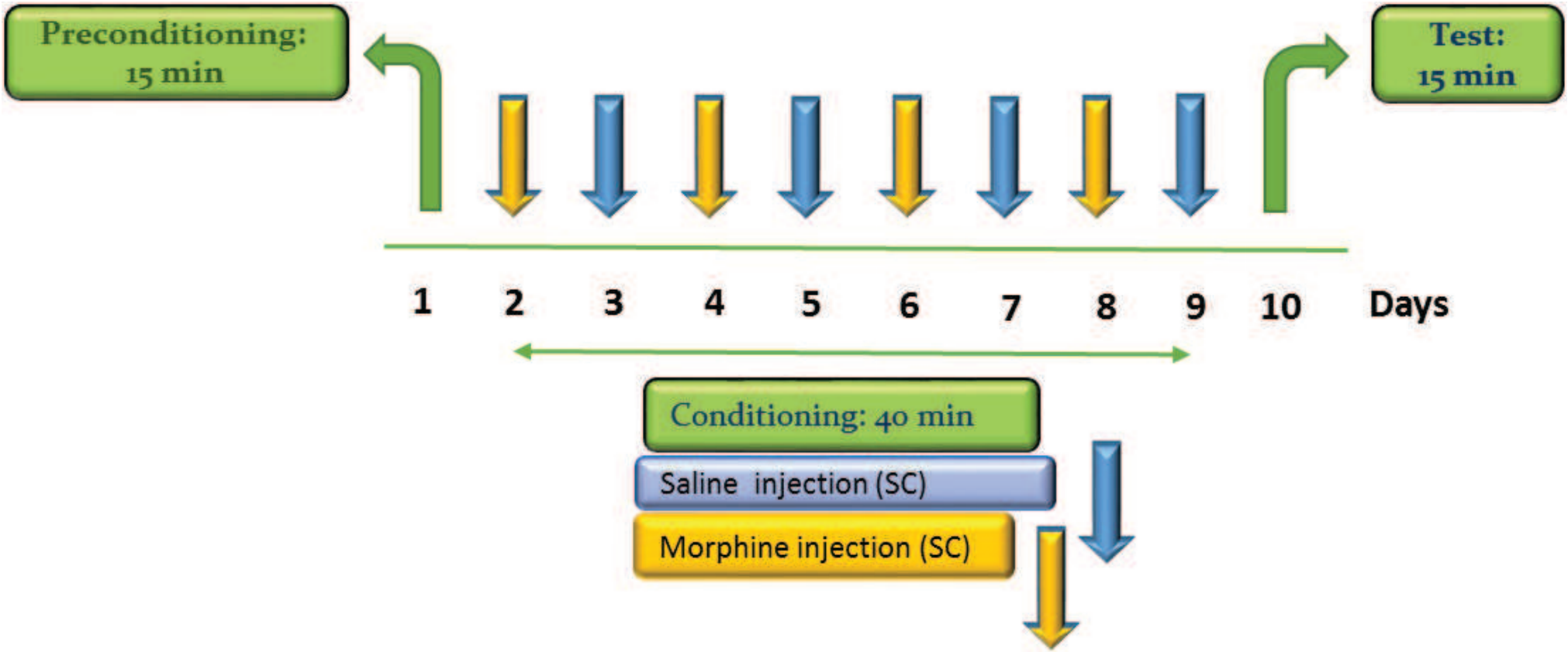
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

We will subject rats to the morphine-induced conditioned place preference (CPP) test. The primary outcome parameter is conditioned place preference (preference for drug-associated compartment during the post-test minus the pre-test)
We have the following control groups:
-Saline CPP: control for morphine CPP
-CPP without injection: control for saline CPP, testing whether exposure to the CPP itself causes changes in plasticity
-Repeated morphine injection, time matched with CPP: control for morphine CPP, testing whether plasticity changes are related to morphine-induced emotional memory and not just the rewarding effects of morphine
-Repeated saline injection, time matched with CPP: control for saline CPP and repeated morphine injection
-Single morphine injection: control for repeated morphine injection, acute morphine effect (no sensitization as may occur upon repeated drug exposure)
-Single saline injection: control for repeated saline and single morphine injection, acute injection stress effect

Then, the animals are divided into separate, independent two groups:
1. In vivo electrophysiology: we measure LTP induction
2. Ex vivo epigenetics: we measure global DNA methylation

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

Morphine-induced conditioned place preference (CPP)**:** To measure morphine-induced contextual memory rats are tested in available three-compartment chambers which are visually distinctive. The CPP training consists of three different phases: preconditioning (day 1), conditioning (day 2-9) and post-conditioning (day 10). During preconditioning I determine the initial preference for either compartment. The rats are individually placed in the intermediate compartment and allowed to freely the whole chamber for 15 min. During conditioning (40 min/day), morphine CPP rats will be subcutaneously injected with morphine (10 mg/kg) and immediately placed in the least preferred compartment. The next day the CCP rats will be treated with saline and then be confined to the opposite compartment. This injection order will be repeated for 8 consecutive days. Rats in the saline CPP group will receive saline during all conditioning days. At the test day rats are given free access to the entire chamber for 15 min without receiving any injection. Time spent in each compartment will be measured using tracking software (EthovisionÒ). Time spend in the conditioning chamber during the post-test minus the pre-test defines CPP.
The CPP will be done according to the following scheme:


Preconditioning:
15 min
Test:
15 min
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Days
Conditioning: 40 min
Saline injection (SC)
Morphine injection (SC)

Day	Test	Cage compartment	Time
Day 1	Pre-test	Free access to all 3	15 min
Day 2	Morphine s.c	1	40 min
Day 3	Saline s.c	3	40 min
Day 4	Morphine s.c	1	40 min
Day 5	Saline s.c	3	40 min
Day 6	Morphine s.c	1	40 min
Day 7	Saline s.c	3	40 min
Day 8	Morphine s.c	1	40 min
Day 9	Saline s.c	3	40 min
Day 10	Post test	Free access to all 3	15 min

Experiment 1: LTP: Electrophysiological recordings:

Seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be submitted to stereotactic surgery to implant electrodes into the ventral hippocampus of the brain. Stereotactic surgery (surgery time: approximately 45-60 minutes) will be performed under isoflurane anesthesia. After anesthetizing , the head is fixed in a stereotaxic head-holder. The skull will be exposed and a concentric bipolar stimulating electrode will be placed in the ventral hippocampus to stimulate the schaffer collateral. A recording electrode will be lowered in the ventral CA1 until the maximal response will observed. Then the electrodes will be fixed with dental cement on the skull. After recovery and performing the CPP test, immediately after the post-test, paired pulse facilitation will be recorded 30 min before and after LTP induction (8 brief high-frequency conditioning stimulus trains (each consisting of 10 pulses at 250 Hz) at a frequency of one train per 30 s). Then animals anesthetized and brain will remove to do histological verification.

Experiment 2: Collecting samples and global DNA methylation analysis:
A new set of seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be used for DNA methylation study. Two hours after CPP testing (post-conditioning), the rats will be decapitated without anesthesia
(anesthesia might influence epigenetic processes and gene expression). Then the ventral hippocampus will bilaterally dissected. The changes of global DNA methylation will be examined in the ventral hippocamus. Global DNA methylation analysis: The global measurements of DNA methylation will performed as described previously (Song et al., 2005) with some modifications. DNA will be hydrolyzed to deoxyribonucleosides and the products will be analyzed for global DNA methylation on an Agilent 1200 series rapid resolution liquid chromatography-QQQ mass spectroscopy system (Palo Alto, CA, USA).

References:
Song, Liguo, et al. "Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Analytical chemistry* 77.2 (2005): 504-510.

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

Data will be analyzed using one-way ANOVAs. Group sizes will be determined using a poweranalysis. Based on previous work (Homberg, 2007) we estimate group sizes at 12 per experimental group.
For experiment 1 we will use 12 rats per group. We have 7 groups including: morphine-CPP, saline- CPP, CPP without injection, single morphine injection, single saline injection, repeated morphine injection time matched with CPP, and repeated saline injection time matched with CPP. In total we will need: 12 x 7 = 84 rats.
For experiment 2 we will use 12 rats per group. We have 7 groups as mentioned above. In total we will need: 12 x 7 = 84 rats.
Total of animals: 168 rats

Reference:
Homberg JR, De Boer SF, Raasø HS, Olivier JD, Verheul M, Ronken E, Cools AR, Ellenbroek BA, Schoffelmeer AN, Vanderschuren LJ, De Vries TJ,

Cuppen E. Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. Psychopharmacology (Berl). 2008 Oct;200(3):367-80.

B. The animals

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

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 168.
We use male rats, because drug addiction is more prevalent in males compared to females (SAMHSA 2014, EMCDDA 2016).

References
SAMHSA (2014). "Mental Health Services Administration.(2013) Results from the 2012 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings." Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement
The rat is the best animal model to perform behavioral studies to investigate addiction disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use less complex animals. Specific neural projections cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints. Cell-lines cannot be used because we need link neurochemical and neural activity changes to changes in behavior.
Reduction
The requested amount of animals is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. Furthermore, the same animals will be used for the behavioral paradigm and electrophysiology or epigenetic study together to obtain a high number of information, thereby leading to a minimal amount of animals needed. Lower animals cannot be used because the surgery procedures are relatively complicated leading to an unacceptable high exclusion of animals (in which the position of the electrode might be wrong) and also all rats in CPP may be not conditioned.
Refinement
The experiments will be carried out with the least discomfort possible. For this reason, cage enrichment will be applied. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will sacrifice the animals.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals will be monitored daily and closely by the caretakers and scored individually for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions and weighted once a week. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals.
Surgery (implanting electrode in hippocampus for electrophysiology recording) will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine injection).
Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

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

After surgery the animals will housed individually because we will fix the electrodes in the skull of animals and we should be careful to not hurts the electrodes. If the animals are housed in groups they start to touch the electrodes on the head of other animals and this is what we want to prevent; it can lead to drop-out of animals. After surgery the animals will have 1 week recovery. There are 10 days needed for CPP testing, and in the CPP test day we will do electrophysiology. So in total we need to keep animals for 17 days in individual cages.

G. Location where the animals procedures are performed

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

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

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

H. Pain and pain relief

[] No > Continue with question I.

[X] Yes > Will anaesthesia, analgesiaor other pain relieving methods be used?

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

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

We will handle the animals at least 3 days for 5 min before the start of an experiment. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be subcutaneously injected with Rimadyl (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to CPP test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the CPP test the rats will receive morphine injection (10 mg/kg). Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. Rats are singly housed, which also causes stress. Morphine injection it is not compromising health.

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

Besides standard prevention measures such as anesthesia, painkilling and cage enrich, there are no other preventive measures. All handlings are necessary for this project. Notably, while single housing causes stress, this stress is expected to be less than damage to the electrode and its skulls attachment caused by a cagemate.

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one/two days is considered as humane endpoints. Also general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. Due to the surgeries and the placing of a electrodes some additional endpoints are taken into account: losing of the electrodes and weight loss of more than 15% for 3 consecutive days after the surgery. We will contact a veterinarian if there is doubt.
*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to experimental parts requiring surgeries, and the drop-out has been included in the number of animals we request

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).

Suffering	Rats	undergo	Number of animals	Experiment	
Moderate	male	1 surgery, CPP and perfusion	84	1	50%
Mild	male	CPP and decapitating	84	2	50%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

Experiment 1: Rats will be sacrificed by perfusion under deep anesthesia, to obtain fixed brains for validation of the placement of the electrodes site
Experiment 2: Rats will be sacrificed by decapitation without anesthesia for molecular studies.

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

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

[X] Yes

5.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2017-0035
2. Titel van het project: Examining the synaptic plasticity and epigenetics of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse
3. Titel van de NTS: Morfine-gerelateerd emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus

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

5. Contactgegevens DEC:
   - naam DEC: RUDEC
   - telefoonnummer contactpersoon: [redacted], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
   - e-mailadres contactpersoon: [redacted]

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   ☒ ontvangen door DEC: 20-06-2017
   ☐ aanvraag compleet
   ☒ in vergadering besproken: 04-07-2017
   ☐ anderszins behandeld
   ☒ termijnonderbreking(en) van 10-07-2017 tot 25-07-2017
   ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
   ☒ aanpassing aanvraag: 24-07-2017
   ☒ advies aan CCD: 24-08-2017

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.

8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.

9. Correspondentie met de aanvrager:
   - Datum vragen: 10-07-2017
   - Datum antwoorden: 25-07-2017
   - Gestelde vragen en antwoorden:

   Algemeen:
   -Een looptijd van 5 jaar lijkt vrij lang voor dit onderzoek. Waarom is dit aangevraagd?
   Antwoord: This happened out of habit, when starting up a new protocol in Iventionles. We have reduced the duration to 2.5 years (to anticipate planned animal facility constructions).
   -Dezelfde persoon kan niet projectleider, verantwoordelijk onderzoeker en vervangend onderzoeker zijn. De commissie verzoekt de aanvrager ten minste een vervangende onderzoeker aan te wijzen.
   Antwoord: Msc. Mina Sadighi will be project leader, but we cannot yet add her because her registration has to be prolonged, taking time. Will we adjust this as soon as the registration prolongation has been arranged
   Project Proposal:

-3.1: De nieuwste referentie stamt uit 2010. Is er sindsdien niets meer gepubliceerd over dit onderwerp?
Antwoord: Yes, there are new references, which are listed below. We incorporated the text below in section 3.1.

New references for LTP and morphine abuse:
-Morphine has no effect on the magnitude of LTP in the CA1 region of hippocampal slices, but attenuates LTP in vivo (Fakira et al., 2014; Wen et al., 2014). It was found that LTP was slightly impaired in naïve prenatal morphine exposure rats (Tan et al., 2015). In other research it was shown that acute in-vivo morphine administration induces the long-term potentiation (Mor-LTP) of field excitatory postsynaptic potentials at the prefrontal cortex-to-nucleus accumbens shell synapses (Zheng et al., 2014).

New references for DNA methylation:
Upregulation of DNA methyltransferase 3a and 3b and global DNA hypomethylation were observed in the nucleus accumbens core (Nac) of cocaine-pretreated rats (Wright et al., 2015). Higher DNA methylation associated with chronic opioid exposure was reproduced in an independent cohort of opioid-treated as compared to non-opioid-treated pain patients. This suggests that opioids may stimulate DNA methylation (Doehring et al., 2013; Trivedi et al., 2014). In opiate users, increased methylation of 2 CpG dinucleotides in the μ-opioid receptor gene (OPRM1) promoter region has been demonstrated (Ebrahimi et al., 2017).

References:
Doehring A, Oertel BG, Sittl R, Lötsch J (2013) Chronic opioid use is associated with increased DNA methylation correlating with increased clinical pain. PAIN® 154:15-23.
Ebrahimi G, Asadikaram G, Akbari H, Nematollahi MH, Abolhassani M, Shahabinejad G, Khodadadnejad L, Hashemi M (2017) Elevated levels of DNA methylation at the OPRM1 promoter region in men with opioid use disorder. The American journal of drug and alcohol abuse:1-7.
Fakira AK, Portugal GS, Carusillo B, Melyan Z, Morón JA (2014) Increased SK2 channel-mediated negative feedback on NMDAR impairs synaptic plasticity following context-dependent sensitization to morphine. Biological psychiatry 75:105.
Tan JW, Duan TT, Zhou QX, Ding ZY, Jing L, Cao J, Wang LP, Mao RR, Xu L (2015) Impaired contextual fear extinction and hippocampal synaptic plasticity in adult rats induced by prenatal morphine exposure. Addiction biology 20:652-662.
Trivedi M, Shah J, Hodgson N, Byun H-M, Deth R (2014) Morphine Induces Redox-Based Changes in Global DNA Methylation and Retrotransposon Transcription by Inhibition of Excitatory Amino Acid Transporter Type 3–Mediated Cysteine Uptake. Molecular pharmacology 85:747-757.
Wen D, Zang G, Sun D, Yu F, Mei D, Ma C, Cong B (2014) Cholecystokinin-octapeptide restored morphine-induced hippocampal long-term potentiation impairment in rats. Neuroscience letters 559:76-81.
Wright KN, Hollis F, Duclot F, Dossat AM, Strong CE, Francis TC, Mercer R, Feng J, Dietz DM, Lobo MK (2015) Methyl supplementation attenuates cocaine-seeking behaviors and cocaine-induced c-Fos activation in a DNA methylation-dependent manner. Journal of Neuroscience 35:8948-8958.
Zheng Q, Liu Z, Wei C, Han J, Liu Y, Zhang X, Ren W (2014) Activation of the D1 receptors inhibits the long-term potentiation in vivo induced by acute morphine administration through a D1–GluN2A interaction in the nucleus accumbens. Neuroreport 25:1191-1197.

-3.1: De achtergrondbeschrijving is erg gedetailleerd en afgestemd op vakgenoten, waardoor het lastig te volgen is voor de geïnteresseerde leek. Wat zijn de hoofdlijnen? Kan dit begrijpelijker gepresenteerd worden?
Antwoord: We added the following summary to the beginning of section 3.1: In this project we will focus for the first time on the ventral hippocampal mechanisms associated with morphine-induced associative and emotional memory. We hypothesize that morphine as a

stimulus inducing emotional state could entail changes in ventral hippocampal neuroplasticity. To look into these issues, we examined how morphine-induced contextual memory affects neural activity of the ventral hippocampus. For this, long-term potentiation (LTP) as a compelling model for studying the synaptic changes in the strength of interneuronal connections will analyzed and it will be based on the changes in amplitude and slope of excitatory post synaptic responses (EPSP). Furthermore, the effect of morphine-induced conditioned place preference on epigenetic modification of genes, DNA methylation, in the ventral hippocampus will studied.

-3.3: De gepresenteerde relevantie is erg algemeen gehouden. Kunnen de onderzoekers dit wat uitgebreider beschrijven en meer toespitsen op dit onderzoek?
Antwoord: We have added the following text: The main goal of this research is about long lasting changes in the ventral hippocampus following morphine-associated-context memory. The findings of this project could provide novel insight into the mechanism by which morphine, and potentially other opioids, can influence on addiction-related plastic alterations and as a results drug seeking behavior and drug relapse. Since epigenetic and neural activity changes are implicated in drug addiction, this study could serve as a useful resource for investigators to explore a novel mechanism of action for other drugs of abuse.

-3.4.3: Is experiment twee zinvol wanneer er geen LTP verschillen worden gevonden? Als zich hier een go/no go moment bevindt, dan dient dit duidelijk omschreven te worden.
Antwoord: These are two separate experiments. In experiment one we are going to investigate the effect of morphine induced CPP on neural activity and we will measure LTP. In the second experiment we will focus on gene changes as a consequence of morphine induced CPP. At the end if we could find any correlation between two experiments we can discuss more about the mechanism of neural activity changes. Findings can however be independent.

Description of Animal Procedures:
*DAP1
-A2: Er staat dat alle dieren een stereotactische operatie ondergaan. Dit is toch niet nodig wanneer de dieren gebruikt worden voor de DNA methyleringsstudie? Uit de beschrijving bij A1 blijkt dat de dieren in twee groepen worden verdeeld, waarbij electrofysiologie bij één deel van de dieren wordt uitgevoerd.
Antwoord: In this part we have a subtitle about LTP and electrophysiology recording. In this part we explained about animal's surgery and electrophysiology and it shows that we do surgery for LTP recording. For experiment 2 we will apply decapitation to continue with the DNA methylation study; there is no need for a surgery. So we will do stereotaxic surgery just for experiment 1 animals. We have clarified that experiment 1 and 2 are separate experiments and that no surgery is needed for experiment 2.

-F: Zullen er dieren individueel gehuisvest worden na de stereotactische operatie? Indien van toepassing hier graag vermelden, evenals de lengte van deze huisvesting en de onderbouwing van de noodzaak.
Antwoord: After surgery the animals will housed individually because we will fix the electrodes in the skull of animals and we should be careful to not hurts the electrodes. If the animals are housed in groups they start to touch the electrodes on the head of other animals and this is what we want to prevent; it can lead to drop-out of animals. After surgery the animals will have 1 week recovery. There are 10 days needed for CPP testing, and at the CPP test day we will perform the electrophysiological recordings. So in total we need to keep animals for 17 days in individual cages. We have added this to section F.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover 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 concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project van beperkte omvang. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 4b uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project voort te zetten. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.

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

   Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken of het emotionele geheugen voor morfine verslaving geassocieerd is met door morfine veroorzaakte veranderingen in neuronale plasticiteit en epigenetische veranderingen in de ventrale hippocampus. Het uiteindelijke doel is meer inzicht te verkrijgen in mechanismen die een rol spelen bij verslaving, zodat uiteindelijk nieuwe behandelingen voor drugsverslaafden ontwikkeld kunnen worden. De onderzoekers zullen de veranderingen in plasticiteit en epigenetica van de ventrale hippocampus veroorzaakt door morfineverslaving onderzoeken. Dit geeft een indicatie van de mechanismen die mogelijk betrokken zijn bij verslaving, maar levert niet direct bruikbare handvatten voor nieuwe behandelingen. Er is daarom binnen deze aanvraag geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van de mechanismen die betrokken zijn bij het ontstaan van drugsverslaving nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen, en dat er behoefte is aan nieuwe behandelingen voor drugsverslaving. Naar de mening van de DEC is het doel van

deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/samenleving.
   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 pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
   Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
   Voor de doelgroep en de samenleving is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor drugsverslaving. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan effectievere behandeling van verslaving, bijvoorbeeld omdat men de verslaafde medicamenteus of anderszins kan ondersteunen bij het staken van het gebruik van de verslavende middelen. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor (drugs)verslaving, is van groot belang voor de samenleving.

6. De onderzoekers vermelden geen onbedoelde effecten op het milieu. De DEC ziet geen redenen om aan te nemen dat die er wel zijn.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager beschikt over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.

8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen 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 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)

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

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor de dieren wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de stereotactische operatie en de gedragstesten. Het cumulatieve ongerief voor de helft van de dieren wordt ingeschat als matig door de combinatie van gedragstesten en de operatie. Voor de overige dieren is het ongerief licht: zij worden niet geopereerd.

12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door de gevolgen van de morfinetoediening en het instrumentele gebruik van de dieren dat inherent is aan het doen van dierproeven.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met dit ratmodel ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderzoekers willen veranderingen in gedrag koppelen aan veranderingen in neurale activiteit en epigenetische effecten in het DNA. Dit kan niet zonder proefdieren worden onderzocht.

15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Op basis van poweranalyses wordt de benodigde groepsgrootte berekend.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De rat is het kleinste dier met een voldoende uitgebreid gedragsrepertoire waarin de benodigde operaties met een hoog slagingspercentage kunnen worden uitgevoerd. De dieren ontvangen adequate pijnstilling voor de handelingen waarvoor dit vereist is. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: we gebruiken mannelijke ratten omdat drugsverslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. De DEC is van mening dat de aanvrager het gebruik van uitsluitend mannelijke dieren in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. Het (ook) gebruiken van vrouwelijke dieren in dit fundamentele stadium van het onderzoek zou naar

het oordeel van de DEC bovendien slechts tot gebruik van extra dieren leiden, zonder dat dit extra informatie oplevert.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

    NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
   Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van de gezondheid en kwaliteit van leven van mensen die verslaafd zijn. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Verslaving aan morfine en andere geneesmiddelen en drugs is moeilijk te behandelen. Veel ex-verslaafden raken toch weer verslaafd, mede omdat er een te sterk geheugen is voor de omgeving waar de effecten van drugs worden ervaren. De resultaten van dit project zullen meer licht werpen op het ontstaan van dit geheugen. Op lange termijn kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van interventies die dit geheugen afzwakken, waardoor een (morfine)verslaving met meer succes behandeld zou kunnen worden. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe therapieën voor (morfine)verslaving van substantieel belang. Meer kennis over geheugenvorming bij verslaving is ook voor andere onderzoeksgebieden van belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken of het emotionele geheugen voor morfine verslaving geassocieerd is met door morfine veroorzaakte veranderingen in neuronale plasticiteit en epigenetische veranderingen in de ventrale hippocampus. Het uiteindelijke doel is meer inzicht te verkrijgen in mechanismen die een rol spelen bij verslaving, zodat uiteindelijk nieuwe behandelingen voor drugsverslaafden ontwikkeld kunnen worden. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de samenleving voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen

voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ De DEC adviseert de vergunning te verlenen

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

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:…
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:…
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:…

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.

6.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
[redacted]
Postbus 9101, t.a.v. CDL, [redacted]
6500 HB NIJMEGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020173165

Bijlagen
2

Datum 25 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2017. Het gaat om uw project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotiona". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020173165. 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 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

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 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	10300
Naam instelling of organisatie:	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	41055629
Straat en huisnummer:	Geert Grooteplein 29
Postbus:	9101, t.a.v. CDL, [redacted]
Postcode en plaats:	6500 HB NIJMEGEN
IBAN:	NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie:	Instantievoor Dierenwelzijn
Telefoonnummer:	[redacted]
E-mailadres:	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

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:	25 september 2017
Geplande einddatum:	1 april 2020
Titel project:	Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotiona
Titel niet-technische samenvatting:	Morfine-gerelateerde emotioneel geheugen en plasticiteit in de hippocampus
Naam DEC:	RU DEC
Postadres DEC:	Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [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:	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats:	Nijmegen
Datum:	25 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn
Postbus 9101, t.a.v. CDL,[redacted]
6500 HB NIJMEGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020173165

Bijlagen
2

Datum 25 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 25 augustus 2017
Vervaldatum: 24 september 2017
Factuurnummer: 173165
Ordernummer: 040823-461220 /2017-0035 / [redacted]

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020173165	€ 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: Info-zbo
Verzonden: woensdag 13 september 2017 11:15
Aan: 'Instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl'
CC: [redacted]
Onderwerp: AVD1030020173165:aanhouden beoordelen

Geachte [redacted],
Op 25 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1030020173165. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.
-U geeft aan dieren in experiment 2 te doden middels decapitatie zonder verdoving. Als reden hiervoor geeft u aan dat anesthesie epigenetica en gen expressie zou kunnen beïnvloeden. Deze onderbouwing is te algemeen en wordt als niet voldoende beschouwd. U wordt gevraagd aan te geven wat hierover bekend is in het kader van uw onderzoek.
- U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De reden hiervoor is dat verslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. Deze onderbouwing is niet voldoende. U wordt daarom verzocht de keuze voor alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen.
- U geeft in de NTS aan dat dieren na de operatie sociaal gehuisvest worden om stress te verminderen. Dit klopt niet. De dieren worden juist individueel gehuisvest. U wordt verzocht dit aan te passen. Daarnaast wordt u verzocht de titel van de
NTS aan te passen en een aantal moeilijke woorden in de NTS te vervangen.

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

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

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

[redacted]
Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 25 augustus 2017 12:14
Aan: Instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
CC:[redacted]
Onderwerp: OntvangstBevestiging 3165
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

8.

Dear CCD committee members,

Thank you for evaluating our proposal with the number AVD1030020173165 (internal number 2017-0035). Please find below how we addressed your questions in the proposal.

Kind regards,

[redacted] and [redacted]

[De bijbehorende documenten (NTS en DAP) zullen via de beveiligde verbinding worden opgestuurd.
Vriendelijke groet,[redacted] **PhD,** Animal Welfare Body RU/Radboudumc,[redacted]

Question 1:

U geeft aan dieren in experiment 2 te doden middels decapitatie zonder verdoving. Als reden hiervoor geeft u aan dat anesthesie epigenetica en gen expressie zou kunnen beïnvloeden. Deze onderbouwing is te algemeen en wordt als niet voldoende beschouwd. U wordt gevraagd aan te geven wat hierover bekend is in het kader van uw onderzoek

Answer: Exposure to a drug may lead to altered regulation of hundreds of genes or more. General anesthetics were once believed to be 'drugs without receptors' but this view has been largely abandoned. During the past decade significant progress in understanding of the mechanisms of general anesthetic action at the molecular, cellular and neural systems levels has been made (1,2). Exposure to general anesthesia causes substantial epigenetic modulations. Epigenetic mechanisms translate environmental influences into changes in the expression of target genes (3). Enzymatic modifications (*e.g.*, acetylation, methylation, phosphorylation) of amino acids in the *N*-terminus of histones lead to dramatic changes in chromatin structure (4). Data from the literature show that general anesthesia causes H3 hypoacetylation of *N*-terminal lysines, an epigenetic change known to result in the condensed conformation of chromatin which is less conducive to transcription (5). Transcription of two target genes, *BDNF* and *c-Fos*, was indeed decreased by anesthesia, a change that occurred at least in part due to histone hypoacetylation in their promotor regions. Another study has demonstrated that brief general anesthesia produces changes in gene expression in the hippocampus of rats that last at least 2 days (7?). The affected genes participate in a wide array of processes including cell survival, signal transduction and synaptic plasticity, transcriptional regulation, metabolism, cell cycle, protein biosynthesis, and structural and vesicular processes, implying that multiple molecular processes are still altered 2 days after general anesthesia. This study showed that in anesthetized rats compared to unanesthesized controls, 297 genes were differentially expressed 2 days following anesthesia ($P < 0.05$). Of these, 64% were up-regulated and 36% were down-regulated (figure1) (7). In addition, hippocampal BDNF expression was found to be reduced in adult animals treated with isoflurane (8). It has been shown that general anesthetics also can cause substantial changes in protein expression (Table1) [9,1]. For example, even brief exposure to isoflurane leads to widespread changes in genetic control in the amygdala 6 h after exposure (10). Based on all studies mentioned above, we decided to decapitate rats without using anesthesia to prevent effect of these drugs on epigenetic modifications. Since we aim to study the epigenetic mechanisms associated with morphine-induced contextual memories, and the use of anesthetics would literally make it impossible to make those effects visible.

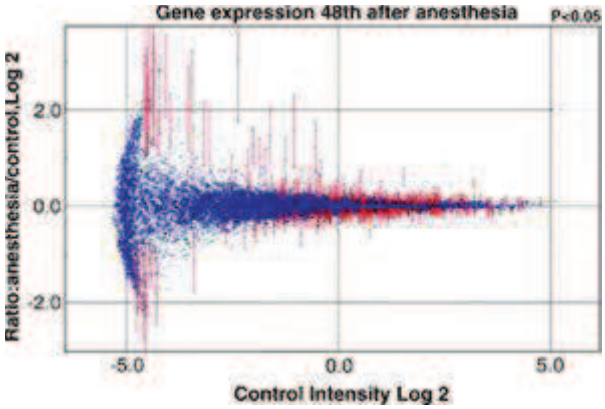


Figure 1. Scatter plot of gene expression ratios between anesthetized and control animals. Data are derived from Affymetrix gene chip analysis and are presented according to expression intensity. Differentially expressed genes ± S.D. are depicted in red (7).

Table 1A. Genes Linked to DNA and RNA Processing Whose Expression is Altered by Isoflurane Exposure

	Cell Cycle	Transcription From DNA			
	Cell Cycle, DNA Replication and Repair	Chromatin Remodeling	Basal Transcription Components	Transcription Factors and Cofactors	Maturation of RNA
Downregulated	Isg20 Mcmd4 Paxip1_pred Recc1	Hmga1 Myst2 "p66alpha Tada3l_pred Thap7_pred		"Rap80 "ZNF277 Miz1 Myt1l Rxrb Siahbp1 Trim28	Adar Cpsf3_pred "FLJ13213 Grsf1_pred Papd1_pred Raly_pred Rbm10 Zfp262_pred
Upregulated	Cdkl1_pred Cdkn2c Cdk4 Dnase2 Lztfl1_pred "Pinx1 Prim1 Recql_pred Sycp3 Unc84b_pred	Asf1a_pred "Set Th2a	Bteb1 Surb7_pred	Egr2 Klf3 Madh3 Mbnl2_pred Mnt_pred Mtf1_pred Nfkbia Tdg Vgll4_pred	Ascc3l1 Ddx49_pred Dhx9_pred Gle1l_pred Hnrpa0_pred "PNN Rnase4 Smn1 Srpk1_pred Ythdf3_pred Znf622_pred

References:

1. Rampil, Ira J., Daryn H. Moller, and Achim H. Bell. "Isoflurane modulates genomic expression in rat amygdala." *Anesthesia & Analgesia* 102.5 (2006): 1431-1438,

2. Csoka, Antonei B., and Moshe Szyf. "Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology." *Medical hypotheses* 73.5 (2009): 770-780.

3. Dalla Massara, Lorenza, et al. "General anesthesia causes epigenetic histone modulation of c-Fos and brain-derived neurotrophic factor, target genes important for neuronal development in the immature rat hippocampus." *The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 124.6 (2016): 1311-1327.

4. Robison, AJ, Nestler, EJ Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction.. *Nat Rev Neurosci*. (2011). *12* 623–37

5. Rudenko, A, Tsai, LH Epigenetic modifications in the nervous system and their impact upon cognitive impairments.. *Neuropharmacology*. (2014). *80* 70–82

6. Stafford, JM, Lattal, KM Is an epigenetic switch the key to persistent extinction?. *Neurobiol Learn Mem*. (2011). *96* 35–40

7. Culley, Deborah J., et al. "Altered hippocampal gene expression 2 days after general anesthesia in rats." *European journal of pharmacology* 549.1 (2006): 71-78.

8. Degos, Vincent, and Pamela Flood. "Are Epigenetic Changes the Key to the Elusive Mechanism for the Long-lasting Effects of Anesthetic Drugs that Persist after Emergence?." *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 124.3 (2016): 530-531.).

9. Pan JZ, Wei H, Hecker JG, Tobias JW, Eckenhoff RG, Eckenhoff MF. Rat brain DNA transcript profile of halothane and isoflurane exposure. Pharmacogenet. Genomics 2006;16:171–82.

10. Pan JZ, Xi J, Eckenhoff MF, Eckenhoff RG. Inhaled anesthetics elicit regionspecific changes in protein expression in mammalian brain. Proteomics 2008;8:2983–92.

-Question 2:

U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De reden hiervoor is dat verslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. Deze onderbouwing is niet voldoende. U wordt daarom verzocht de keuze voor alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen.

Answer: We want to use male rats because of the following reasons:

- The rates of drug abuse are currently lower in women than in men. Adult men are 2–3 times more likely than women to have a drug abuse/dependence disorder (1).

- Morphine withdrawal signs are more marked in males than in females. Dopamine levels, a neurotransmitter which mediates several behavioral effects of opiates, were modified only in male by the morphine withdrawal syndrome (2).

- Male rats are more sensitive to the effects of morphine than female rats. A research study showed that morphine is more potent in males compared with females (3). Sex differences in morphine sensitivity are due to differences in opiate receptor density, binding and localization, as well as sex differences in the anatomy and physiology of opiate-responsive neural circuits (4,5,6).

Because males and females differ in terms of vulnerability to drug addiction and their sensitivity to morphine, we cannot mix males and females in a group. When including females, the number of rats required for the

current project would double. Moreover, the male rat data we obtained previously (Sadigi et al. Addiction Biology, in press) that serve as a basis for the present project would require extension to females. The costs (a substantial increase in the number of animals) do not weigh against the benefits (understanding the neurobiological mechanisms underlying morphine addiction in females, which are 2-3 times less likely to become addicted than males). Therefore, we believe it is scientifically sound to use male rats in the current project.

The arguments in the DAP text have been extended in line with the information given above.

References:

1. Becker, Jill B., and Ming Hu. "Sex differences in drug abuse. Frontiers in neuroendocrinology 29.1 (2008): 36-47.
2. Diaz, Silvina L., et al. Morphine withdrawal syndrome and its prevention with baclofen: Autoradiographic study of μ-opioid receptors in prepubertal male and female mice. *Synapse* 60.2 (2006): 132-140.
3. Peckham, Elizabeth M., and John R. Traynor (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 316.3: 1195-1201.
4. Loyd DR, Murphy AZ (2006) Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. J Comp Neurol 496:723–738
5. Loyd DR, Murphy AZ (2008) Androgen and estrogen receptor localization on periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary neurons in the male and female rat. J Chem Neuroanat 36:216–226.
6. Loyd DR, Morgan MM, Murphy AZ (2007) Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. Neuroscience 147:456–468.

Question 3:

- U geeft in de NTS aan dat dieren na de operatie sociaal gehuisvest worden om stress te verminderen. Dit klopt niet. De dieren worden juist individueel gehuisvest. U wordt verzocht dit aan te passen. Daarnaast wordt u verzocht de titel van de NTS aan te passen en een aantal moeilijke woorden in de NTS te vervangen

Answer: Thank you for noticing this error. We have corrected it. The title has been changed into: “Onderzoek naar de hersen mechanismen die ten grondslag liggen aan drug-gerelateerd geheugen”

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: woensdag 13 september 2017 11:14
Aan: Postbus instantie voor dierenwelzijn

CC: [redacted]
Onderwerp: AVD1030020173165:aanhouden beoordelen

Geachte [redacted],

Op 25 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD1030020173165. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

-U geeft aan dieren in experiment 2 te doden middels decapitatie zonder verdoving. Als reden hiervoor geeft u aan dat anesthesie epigenetica en gen expressie zou kunnen beïnvloeden. Deze onderbouwing is te algemeen en wordt als niet voldoende beschouwd. U wordt gevraagd aan te geven wat hierover bekend is in het kader van uw onderzoek.

- U geeft aan alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De reden hiervoor is dat verslaving meer voorkomt bij mannen dan bij vrouwen. Deze onderbouwing is niet voldoende. U wordt daarom verzocht de keuze voor alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen.

- U geeft in de NTS aan dat dieren na de operatie sociaal gehuisvest worden om stress te verminderen. Dit klopt niet. De dieren worden juist individueel gehuisvest. U wordt verzocht dit aan te passen. Daarnaast wordt u verzocht de titel van de
NTS aan te passen en een aantal moeilijke woorden in de NTS te vervangen.

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

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

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

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

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

-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 25 augustus 2017 12:14
Aan: Instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
CC: [redacted]
Onderwerp: OntvangstBevestiging 3165

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

9.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Behaviour

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

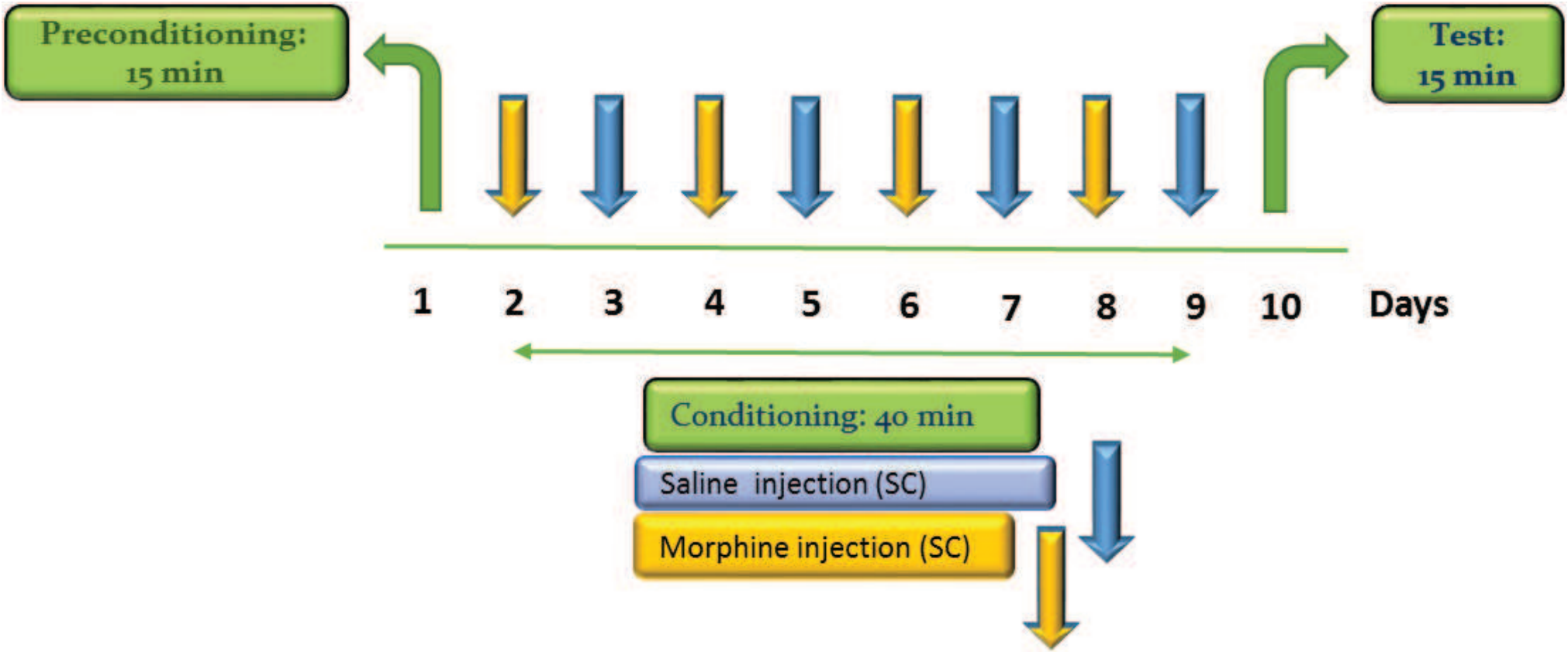
Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

We will subject rats to the morphine-induced conditioned place preference (CPP) test. The primary outcome parameter is conditioned place preference (preference for drug-associated compartment during the post-test minus the pre-test)
We have the following control groups:
-Saline CPP: control for morphine CPP
-CPP without injection: control for saline CPP, testing whether exposure to the CPP itself causes changes in plasticity
-Repeated morphine injection, time matched with CPP: control for morphine CPP, testing whether plasticity changes are related to morphine-induced emotional memory and not just the rewarding effects of morphine
-Repeated saline injection, time matched with CPP: control for saline CPP and repeated morphine injection
-Single morphine injection: control for repeated morphine injection, acute morphine effect (no sensitization as may occur upon repeated drug exposure)
-Single saline injection: control for repeated saline and single morphine injection, acute injection stress effect

Then, the animals are divided into separate, independent two groups:
1. In vivo electrophysiology: we measure LTP induction
2. Ex vivo epigenetics: we measure global DNA methylation

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

Morphine-induced conditioned place preference (CPP)**:** To measure morphine-induced contextual memory rats are tested in available three-compartment chambers which are visually distinctive. The CPP training consists of three different phases: preconditioning (day 1), conditioning (day 2-9) and post-conditioning (day 10). During preconditioning I determine the initial preference for either compartment. The rats are individually placed in the intermediate compartment and allowed to freely the whole chamber for 15 min. During conditioning (40 min/day), morphine CPP rats will be subcutaneously injected with morphine (10 mg/kg) and immediately placed in the least preferred compartment. The next day the CCP rats will be treated with saline and then be confined to the opposite compartment. This injection order will be repeated for 8 consecutive days. Rats in the saline CPP group will receive saline during all conditioning days. At the test day rats are given free access to the entire chamber for 15 min without receiving any injection. Time spent in each compartment will be measured using tracking software (EthovisionÒ). Time spend in the conditioning chamber during the post-test minus the pre-test defines CPP.
The CPP will be done according to the following scheme:


Preconditioning:
15 min
Test:
15 min
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
Days
Conditioning: 40 min
Saline injection (SC)
Morphine injection (SC)

Day	Test	Cage compartment	Time
Day 1	Pre-test	Free access to all 3	15 min
Day 2	Morphine s.c	1	40 min
Day 3	Saline s.c	3	40 min
Day 4	Morphine s.c	1	40 min
Day 5	Saline s.c	3	40 min
Day 6	Morphine s.c	1	40 min
Day 7	Saline s.c	3	40 min
Day 8	Morphine s.c	1	40 min
Day 9	Saline s.c	3	40 min
Day 10	Post test	Free access to all 3	15 min

Experiment 1: LTP: Electrophysiological recordings:

Seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be submitted to stereotactic surgery to implant electrodes into the ventral hippocampus of the brain. Stereotactic surgery (surgery time: approximately 45-60 minutes) will be performed under isoflurane anesthesia. After anesthetizing , the head is fixed in a stereotaxic head-holder. The skull will be exposed and a concentric bipolar stimulating electrode will be placed in the ventral hippocampus to stimulate the schaffer collateral. A recording electrode will be lowered in the ventral CA1 until the maximal response will observed. Then the electrodes will be fixed with dental cement on the skull. After recovery and performing the CPP test, immediately after the post-test, paired pulse facilitation will be recorded 30 min before and after LTP induction (8 brief high-frequency conditioning stimulus trains (each consisting of 10 pulses at 250 Hz) at a frequency of one train per 30 s). Then animals anesthetized and brain will remove to do histological verification.

Experiment 2: Collecting samples and global DNA methylation analysis:
A new set of seven groups of rats (morphine-CPP, saline-CPP, CPP without injection, repeated morphine injection without treatment in CPP box, repeated saline injection without treatment in CPP box, single morphine injection and single saline injection) will be used for DNA methylation study. Two hours after CPP testing (post-conditioning), the rats will be decapitated without anesthesia (anesthesia might influence epigenetic processes and gene expression). Then the ventral hippocampus will bilaterally dissected. The changes of global DNA methylation will be examined in the ventral hippocamus. Global DNA methylation analysis: The global measurements of DNA methylation will performed as described previously (Song et al., 2005) with some modifications. DNA will be hydrolyzed to deoxyribonucleosides and the products will be analyzed for global DNA methylation on an Agilent 1200 series rapid resolution liquid chromatography-QQQ mass spectroscopy system (Palo Alto, CA, USA).

References:
Song, Liguo, et al. "Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry." *Analytical chemistry* 77.2 (2005): 504-510.

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

Data will be analyzed using one-way ANOVAs. Group sizes will be determined using a poweranalysis. Based on previous work (Homberg, 2007) we estimate group sizes at 12 per experimental group.
For experiment 1 we will use 12 rats per group. We have 7 groups including: morphine-CPP, saline- CPP, CPP without injection, single morphine injection, single saline injection, repeated morphine injection time matched with CPP, and repeated saline injection time matched with CPP. In total we will need: 12 x 7 = 84 rats.
For experiment 2 we will use 12 rats per group. We have 7 groups as mentioned above. In total we will need: 12 x 7 = 84 rats.
Total of animals: 168 rats

Reference:
Homberg JR, De Boer SF, Raasø HS, Olivier JD, Verheul M, Ronken E, Cools AR, Ellenbroek BA, Schoffelmeer AN, Vanderschuren LJ, De Vries TJ,

Cuppen E. Adaptations in pre- and postsynaptic 5-HT1A receptor function and cocaine supersensitivity in serotonin transporter knockout rats. Psychopharmacology (Berl). 2008 Oct;200(3):367-80.

B. The animals

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

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 168.
We use male rats, because of the following reasons:

- The rates of drug abuse are currently lower in women than in men. Adult men are 2–3 times more likely than women to have a drug abuse/dependence disorder (1).
- Morphine withdrawal signs are more marked in males than in females. Dopamine levels, a neurotransmitter which mediates several behavioral effects of opiates, were modified only in male by the morphine withdrawal syndrome (2).
- Male rats are more sensitive to the effects of morphine than female rats. A research study showed that morphine is more potent in males compared with females (3). Sex differences in morphine sensitivity are due to differences in opiate receptor density, binding and localization, as well as sex differences in the anatomy and physiology of opiate-responsive neural circuits (4,5,6).

Because males and females differ in terms of vulnerability to drug addiction and their sensitivity to morphine, we cannot mix males and females in a group. When including females, the number of rats required for the current project would double. Moreover, the male rat data we obtained previously (Sadigi et al. Addiction Biology, in press) that serve as a basis for the present project would require extension to females. The costs (a substantial increase in the number of animals) do not weigh against the benefits (understanding the neurobiological mechanisms underlying morphine addiction in females, which are 2-3 times less likely to become addicted than males). Therefore, we believe it is scientifically sound to use male rats in the current project.
The arguments in the DAP text have been extended in line with the information given above.

References:

1. Becker, Jill B., and Ming Hu. "Sex differences in drug abuse. Frontiers in neuroendocrinology 29.1 (2008): 36-47.

2. Diaz, Silvina L., et al. Morphine withdrawal syndrome and its prevention with baclofen: Autoradiographic study of μ-opioid receptors in prepubertal male and female mice. *Synapse* 60.2 (2006): 132-140.

3. Peckham, Elizabeth M., and John R. Traynor (2006). Comparison of the antinociceptive response to morphine and morphine-like compounds in male and female Sprague-Dawley rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 316.3: 1195-1201.

4. Loyd DR, Murphy AZ (2006) Sex differences in the anatomical and functional organization of the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the rat: a potential circuit mediating the sexually dimorphic actions of morphine. J Comp Neurol 496:723–738

5. Loyd DR, Murphy AZ (2008) Androgen and estrogen receptor localization on periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary neurons in the male and female rat. J Chem Neuroanat 36:216–226.

6. Loyd DR, Morgan MM, Murphy AZ (2007) Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. Neuroscience 147:456–468.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult
Rat (Sprague Dawley)	Harlan/Charles River	84	Adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

[X] No, continue with question D.
[] Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement
The rat is the best animal model to perform behavioral studies to investigate addiction disorders. Because of the complexity of these kind of disorders, it is impossible to use less complex animals. Specific neural projections cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints. Cell-lines cannot be used because we need link neurochemical and neural activity changes to changes in behavior.
Reduction
The requested amount of animals is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. Furthermore, the same animals will be used for the behavioral paradigm and electrophysiology or epigenetic study together to obtain a high number of information, thereby leading to a minimal amount of animals needed. Lower animals cannot be used because the surgery procedures are relatively complicated leading to an unacceptable high exclusion of animals (in which the position of the electrode might be wrong) and also all rats in CPP may be not conditioned.
Refinement
The experiments will be carried out with the least discomfort possible. For this reason, cage enrichment will be applied. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will sacrifice the animals.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals will be monitored daily and closely by the caretakers and scored individually for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions and weighted once a week. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals.
Surgery (implanting electrode in hippocampus for electrophysiology recording) will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine injection).
Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

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

After surgery the animals will housed individually because we will fix the electrodes in the skull of animals and we should be careful to not hurts the electrodes. If the animals are housed in groups they start to touch the electrodes on the head of other animals and this is what we want to prevent; it can lead to drop-out of animals. After surgery the animals will have 1 week recovery. There are 10 days needed for CPP testing, and in the CPP test day we will do electrophysiology. So in total we need to keep animals for 17 days in individual cages.

G. Location where the animals procedures are performed

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

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

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

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

H. Pain and pain relief

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

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

We will handle the animals at least 3 days for 5 min before the start of an experiment. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, lidocaine solution will be injected subcutaneously before cutting the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be subcutaneously injected with Rimadyl (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to CPP test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the CPP test the rats will receive morphine injection (10 mg/kg). Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. Rats are singly housed, which also causes stress. Morphine injection it is not compromising health.

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

Besides standard prevention measures such as anesthesia, painkilling and cage enrich, there are no other preventive measures. All handlings are necessary for this project. Notably, while single housing causes stress, this stress is expected to be less than damage to the electrode and its skulls attachment caused by a cagemate.

J. Humane endpoints

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

[] No > Continue with question K.
[X] Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

The criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one/two days is considered as humane endpoints. Also general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. Due to the surgeries and the placing of a electrodes some additional endpoints are taken into account: losing of the electrodes and weight loss of more than 15% for 3 consecutive days after the surgery. We will contact a veterinarian if there is doubt.
*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to experimental parts requiring surgeries, and the drop-out has been included in the number of animals we request

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).

Suffering	Rats	undergo	Number of animals	Experiment	
Moderate	male	1 surgery, CPP and perfusion	84	1	50%
Mild	male	CPP and decapitating	84	2	50%

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

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

Experiment 1: Rats will be sacrificed by perfusion under deep anesthesia, to obtain fixed brains for validation of the placement of the electrodes site
Experiment 2: Rats will be sacrificed by decapitation without anesthesia for molecular studies.

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

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

[X] Yes

10.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
[redacted]
Postbus 9101, t.a.v. CDL, [redacted]
6500 HB NIJMEGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020173165
Bijlagen
1

Datum 28 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse" met aanvraagnummer AVD1030020173165. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u vragen gesteld over het doden van de dieren, het gebruik van alleen mannelijke dieren en de NTS. Met uw antwoord heeft u een aangepaste bijlage 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 "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2017 tot en met 1 april 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.
Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van

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

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
28 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

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:	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres:	Postbus 9101, t.a.v. CDL, [redacted]
Postcode en plaats:	6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer:	10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2017 tot en met 1 april 2020, voor het project "Examining the synaptic plasticity and epigenetic of ventral hippocampus due to emotional memory associated with morphine abuse" met aanvraagnummer AVD1030020173165, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is UHD.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 26 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2017, ontvangen op 25 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 26 september 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Behaviour				
	Ratten (Rattus norvegicus) /	168	50% Matig 50% 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

Aanvraagnummer:
AVD1030020173165

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:
AVD1030020173165

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.

3184

1.

Centrale Commissie Dierproeven

04 SEP. 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*	10500
☐ 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.

Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[redacted]
KvK-nummer	1179037
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [redacted]
Postbus	
Postcode en plaats	9713 AV Groningen
IBAN	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

(Titel) Naam en voorletters	[redacted]
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 - 8 - 2017
		Einddatum	1 - 6 - 2022
3.2	Wat is de titel van het project?	De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC-RUG
		Postadres	A. Deusinglaan 1, [redacted]
		E-mailadres	[redacted]

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 Lege

☐ Wijziging € Lege

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

☐ Via een eenmalige incasso

☐ Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

☒ Projectvoorstel

☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

☐ Melding Machtiging

☐

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[redacted]
Functie	
Plaats	Groningen
Datum	30 - 08 - 2017
Handtekening	[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven

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.	10500
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	Vul de titel van het project in.	De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie?

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.

Glomerulosclerose (GS), verlittekening van het filter (glomerulus) in de nier, treedt op in patiënten met ziektes als Diabetische Nefropathie (chronische proteïnurie en GS) en Focal Segmental Glomerulosclerosis (acute proteïnurie en GS). Glomerulosclerose is een progressief ziekteproces, wat leidt tot nierfalen.
Tegenwoordig zijn therapeutische behandelingen van GS gericht op remming van ontsteking en verlaging van bloeddruk. Deze behandelingen zijn echter gelimiteerd effectief waardoor de GS veelal leidt tot End-Stage-Renal Disease, waarvan de enige behandelmogelijkheden dialyse en niertransplantatie zijn. Daarnaast is nierfalen geassocieerd met een verhoogd risico op hart-en vaatziekten. Hierdoor hebben GS patiënten een hoger risico op overlijden (Schiffrin et al., Circulation, 2007). Het is van cruciaal belang om meer inzicht te krijgen in de moleculaire en cellulaire pathofysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling en progressie van GS, teneinde nieuwe therapeutische strategieën te kunnen ontwikkelen voor de behandeling van GS.

Proteïnurie, het verlies van eiwit in de urine, is het belangrijkste kenmerk van GS en wordt veroorzaakt door schade aan de glomerulaire filtratie barrière. Deze filtratie barrière bestaat uit 3 lagen: 1) endotheelcellen bedekt met een (door endotheelcellen geproduceerde) slijmlaag (de glycocalyx), 2) de glomerulaire basaal membraan en 3) podocyten. Wanneer een van deze 3 componenten beschadigd raakt, neemt de doorlaatbaarheid van de filtratie barrière toe, waardoor essentiële stoffen en eiwitten uit het bloed in de urine terecht komen en verloren gaan (Patrakka and Tyggvason, Biochem Biophys Res Commun, 2010).

Verscheidene studies laten zien dat beschadiging van endotheel een cruciale rol speelt in de ontwikkeling van GS en dat gezonde endotheelcellen van essentieel belang zijn om de ontwikkeling van GS en nierfalen te voorkomen (Sun et al., PLoS One, 2013; Gil et al., Diabetes, 2016; Nakagawa et al., J Am Soc Nephrol, 2007; Garsen et al., J Am Soc Nephrol, 2016). In de glomerulus staan de verschillende celtypen in nauw contact met elkaar via autocriene en paracriene mechanismen, wat zorgt voor een zeer gebalanceerde communicatie (Schlondorff D et al., J Am Soc Nephrol, 2009). Door beschadiging van het endotheel zijn de signalen van de endotheelcel naar de andere celtypen veranderd, waardoor GS ontstaat (Gnudi, Nephrol Dial Transplant, 2012).

Uit recent eigen onderzoek is gebleken dat het epigenetische enzym Enhancer of Zeste Homologue 2 (EZH2) verhoogd tot expressie komt in glomerulaire endotheelcellen in nierweefsel van muizen met GS. EZH2 plaatst methylgroepen op lysine 27 van histon 3, waardoor de conformatie van het DNA meer gesloten wordt en genexpressie wordt voorkomen. EZH2 komt voor in ieder celtype en is in endotheelcellen van groot belang voor het behoud van endotheelfuncties (Maleszewska et al., Angiogenesis, 2016). Een verhoging van EZH2 in de endotheelcellen zorgt voor een veranderd expressiepatroon van genen geassocieerd met endotheelceldisfunctie, een staat waarin de essentiële functies van het endotheel verminderd aanwezig zijn. Ons onderzoek laat zien dat EZH2 vele genen reguleert die geassocieerd zijn met GS, [redacted], [redacted] en inflammatie (Maleszewska et al., Angiogenesis, 2016; Dreger et al., Hypertension, 2012, eigen preliminaire data). Een verhoogd EZH2 niveau kan daarom een belangrijke schakel zijn in het ontwikkelen van functieverlies van de glomerulus.

Op basis van bovenstaande is onze hypothese dat verlaging van EZH2 in glomerulair endotheel zorgt voor een verminderde ontwikkeling van GS. Om deze hypothese te toetsen stellen we voor middels experimentele therapie de EZH2 expressie [redacted] te verlagen en de invloed hiervan op GS ontwikkeling te onderzoeken.

[redacted]

[redacted]. Tevens wordt in dit project een proof-of-concept geleverd voor het effectief kunnen bereiken en targeten van glomerulair endotheel tijdens glomerulosclerose.

In huidig projectaanvraag zal gebruik gemaakt worden van twee verschillende muismodellen, namelijk een muismodel voor chronische GS (BTBR$^{ob/ob}$) en een muismodel voor acute proteïnurie en GS (anti-Thy1.1). [redacted]

De hypothese die in huidig project gehanteerd wordt is dat verhoogde EZH2 expressie in de glomerulaire endotheelcellen de ontwikkeling en progressie van zowel chronische GS als acute GS veroorzaakt hetgeen leidt tot proteïnurie. Hierbij wordt dan ook onderzocht wat de invloed is van [redacted] verlaging van EZH2.

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?

Hoofddoelstelling: Het bestuderen van de rol van glomerulair [redacted] EZH2 in de ontwikkeling en progressie van glomerulosclerose (GS).

Het doel van dit project is het bestuderen van het effect van [redacted] verlaging van EZH2 in zowel chronische GS als acute GS. [redacted] Op deze manier kan de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 worden onderzocht in de ontwikkeling en progressie van chronische GS en acute GS.

Voor de uitvoering van de hierboven beschreven onderdelen is alle benodigde expertise en infrastructuur aanwezig binnen de afdeling Pathologie en Medische Biologie in het Universitair Medisch Centrum

Groningen. De dierexperimenten worden uitgevoerd in het dieren laboratorium van de Rijksuniversiteit Groningen (Centrale Dienst Proefdieren). Bij de uitvoer van de dierexperimenten is alleen bevoegd en gecertificeerd personeel betrokken. De gekozen proefopstelling is zodoende uitvoerbaar binnen de voorgenomen kaders.

3.3 Belang

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

Glomerulosclerose (GS), verlittekening van het nierfilter (glomerulus), treedt op in patiënten met ziektes als Diabetische Nefropathie (chronische GS) en Focal Segmental Glomerulosclerosis (acute proteïnurie gevolgd door GS). GS is een progressief ziekteproces, wat leidt tot nierfalen. Tegenwoordig zijn therapeutische behandelingen van GS gericht op remming van ontsteking en verlaging van bloeddruk (Fu et al., Am J Physiol Renal Physiol, 2015). Deze behandelingen zijn echter gelimiteerd effectief waardoor de GS veelal leidt tot End-Stage-Renal-Disease, waardoor veel patiënten dialyse en niertransplantatie moeten ondergaan (Gnudi, Nephrol Dial Transplant, 2012; Zschiedrich et al., J Am Soc Nephrol, 2017). Tevens is nierfalen geassocieerd met de ontwikkeling hart-en vaatziekten, waaraan veel patiënten overlijden (Sarnak et al., Circulation, 2003).
Ondanks het feit dat er reeds veel onderzoek is verricht naar de mogelijke onderliggende mechanismen van het ontstaan van GS, is er nog geen therapie die GS kan voorkomen of remmen. Het is daarom van cruciaal belang om meer inzicht te krijgen in de moleculaire en cellulaire pathofysiologische mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling en progressie van GS, en om therapeutische strategieën te ontwikkelen voor de behandeling van GS. Wanneer het verlagen van EZH2 [redacted] resulteert in minder GS, geeft dit de mogelijkheid om GS beter te behandelen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Uit onderzoek uitgevoerd binnen het laboratorium van de [redacted] is gebleken dat EZH2 is verhoogd in de glomerulaire endotheelcellen van muizen met gevorderde chronische glomerulosclerose (GS) (in het BTBR$^{ob/ob}$ model voor diabetische nefropathie; archiefmateriaal van de [redacted]). *In vitro* is in glomerulaire endotheelcellen gevonden dat verhoogd EZH2 bijdraagt aan endotheel disfunctie. Daarom zal in dit onderzoek EZH2 [redacted] tijdens chronische GS, om te onderzoeken wat de rol is van EZH2 [redacted] tijdens de ontwikkeling van GS. Alvorens het dierexperiment uit te voeren, zal eerst worden bestudeerd op welke leeftijd een verhoging van EZH2 opkomt in muizen met chronische GS. Dit zal worden onderzocht in archiefmateriaal tussen de leeftijden van 8 en 24 weken in BTBR$^{ob/ob}$ ten opzichte van BTBR$^{wt/wt}$ (controle muis). [redacted] wordt vastgesteld. Op deze manier kan de rol van EZH2 in de ontwikkeling en progressie van GS worden onderzocht.

De experimenten in de deelprojecten zijn opgedeeld in 3 subonderdelen:

1. [redacted]
2. Het verlagen van EZH2 in glomerulair endotheel in GS [redacted] Wanneer EZH2 succesvol wordt verlaagd, wordt doorgegaan met subonderdeel 3.
3. Interventie studie: Het langdurig targeten van EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel om op deze manier de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 te onderzoeken in de ontwikkeling en progressie van chronische GS.

Wanneer EZH2 kan worden getarget in glomerulaire endotheelcellen in het BTBR$^{ob/ob}$ model (chronische

GS), zal deze targeting ook worden uitgevoerd in het Thy1.1 model (acute GS).

In het muismodel voor chronische GS ontwikkelt GS spontaan als gevolg van de genetische achtergrond van de muizen. In het muismodel voor acute GS wordt GS geïnduceerd door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antilichamen. Hierdoor ontstaat een ontstekingsreactie in de glomerulus en acute proteïnurie met GS tot gevolg. De muismodellen voor chronische GS en acute GS behoeven daardoor een andere experimentele opzet. De experimenten in de twee muismodellen is daarom opgedeeld in twee deelprojecten.

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

Dit project is opgedeeld in twee deelprojecten:
Deelproject 1. Hierin wordt de rol van EZH2 in het glomerulair endotheel onderzocht in een muismodel voor chronische GS (BTBR$^{ob/ob}$ muismodel). Dit deelproject is onderverdeeld in drie subonderdelen:

1. [redacted] een verlaging van EZH2 in het glomerulair endotheel bewerkstelligen tijdens GS. Tevens zal ook in andere organen worden bestudeerd of EZH2 in de endotheelcellen wordt verlaagd en wat de effecten hiervan zijn. Wanneer de aflevering (subonderdeel 1) en verlaging van EZH2 (subonderdeel 2) in de glomerulaire endotheelcellen succesvol is, wordt doorgegaan met subonderdeel 3.
3. Interventiestudie: Het langdurig targeten van EZH2 [redacted] om de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 te onderzoeken in de ontwikkeling en progressie van GS. Tevens wordt een experimentele groep behandeld met een farmacologische inhibitor van EZH2 als positieve controle.

In **deelproject 2** zullen de 3 bovengenoemde subonderdelen in een muismodel voor acute GS (anti-Thy1.1 muismodel) worden uitgevoerd en bestudeerd. Dit wordt gedaan om de algemene toepasbaarheid van de bevindingen uit de studies in chronische GS te toetsen.

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

Dit project is opgedeeld in 2 deelprojecten, welke beide zijn opgedeeld in 3 subonderdelen:
Er wordt gestart met **deelproject 1**, welke het doel heeft de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 tijdens chronische glomerulosclerose (GS) te onderzoeken. Deelproject 1 is onder te verdelen in de volgende subonderdelen met bijbehorende go/no go beslissingen:

1. [redacted]. Hierbij wordt tevens de biodistributie en eventuele nier- en levertoxiciteit [redacted] onderzocht. Wanneer dit succesvol is, wordt doorgegaan met subonderdeel 2. Wanneer niet succesvol of een te hoge nier- en/of levertoxiciteit ontstaat, zal het experiment niet verder worden uitgevoerd (NO GO). [redacted]
2. Onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in het glomerulair endotheel bewerkstelligen tijdens GS. Tevens zal ook in andere organen worden bestudeerd of EZH2 in de endotheelcellen wordt verlaagd en wat de effecten hiervan zijn. Wanneer verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen succesvol is, wordt

doorgegaan met subonderdeel 3. Wanneer dit niet succesvol is, zal niet worden doorgegaan met het experiment (NO GO). [redacted]

Alvorens subonderdeel 3 wordt uitgevoerd, zal een pilot experiment worden uitgevoerd. Wanneer niet de beoogde effectgrootte wordt behaald in de pilot, zal niet worden doorgegaan met subonderdeel 3.

3. Interventiestudie: Het langdurig targeten van EZH2 [redacted] om de rol van glomerulair endotheliaal EZH2 te onderzoeken in de ontwikkeling en progressie van GS.

In **deelproject 2** zullen de 3 bovengenoemde subonderdelen in een muismodel voor acute GS (anti-Thy1.1 muismodel) worden uitgevoerd en bestudeerd. Dit wordt gedaan om de algemene toepasbaarheid van de bevindingen uit de studies in chronische GS te toetsen.In deelproject 2 zijn aan het eind van subonderdelen 1 en 2 dezelfde go/no go punten aanwezig als in deelproject 1.

Het is nog niet bekend of een verhoging van EZH2 ook aanwezig is in glomerulaire endotheelcellen in het muismodel voor GS na acute proteïnurie (anti-Thy1.1). Dit zal eerst worden onderzocht in archiefmateriaal, alvorens deelproject 2 wordt uitgevoerd. Wanneer EZH2 verhoogd blijkt te zijn in de glomerulaire endotheelcellen in het anti-Thy1.1 muismodel zal deelproject 2 worden uitgevoerd.

In beide deelprojecten kunnen de resultaten van subonderdeel 1 subonderdeel 2 blokkeren, en de resultaten van subonderdeel 2 en het pilotexperiment kunnen subonderdeel 3 blokkeren. [redacted] **Hierdoor wordt verwacht dat de subonderdelen 1 en 2 van deelprojecten 1 en 2 de totale deelprojecten 1 en 2 niet zullen blokkeren.**

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS
2	Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS
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	Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen.
1.2	Looptijd van het project	01-11-2017 – 01-11-2022
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Glomerulosclerose, verlittekening, endotheel, EZH2

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)	Een belangrijke taak van de nieren is het verwijderen van afvalstoffen uit het bloed. De eerste stap van dit zuiveringsproces is filtratie; bloedvloeistof wordt door het filter in zeeflichamen (glomeruli) geperst en opgevangen. Bloedcellen en grote eiwitten blijven achter in het bloed. Veel nierziekten hebben te maken met de toestand van de zeef in deze glomeruli. Glomerulosclerose, verlittekening van de zeeflichamen in de nier, leidt tot nierfalen. Slecht functionerende cellen in de zeeflichamen – het gaat om de zgn. glomerulaire endotheelcellen - spelen een cruciale rol in de ontwikkeling en voortgang van glomerulosclerose. Het eiwit EZH2 is in verhoogde mate aanwezig in glomerulaire endotheelcellen tijdens glomerulosclerose en lijkt

		een sleutelrol te spelen in het disfunctioneren van de endotheelcellen. Dit project heeft twee doelstellingen: 1. De bijdrage van het glomerulair endotheel aan de ontwikkeling en progressie van glomerulosclerose en de rol van EZH2 hierin onderzoeken. 2. Het onderzoeken van de (mogelijk therapeutische) gevolgen van uitschakeling van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen. Voor het behalen van deze doelstellingen hanteren we drie deelvragen: 1. Kunnen stoffen die de aanmaak van EZH2 beïnvloeden worden afgeleverd in het glomerulair endotheel tijdens glomerulosclerose? 2. Kan de aanmaak van EZH2 in het glomerulair endotheel worden stopgezet of verlaagd? 3. Wat is het effect van verlaagd EZH2 in glomerulair endotheel op de ontwikkeling en voortgang van glomerulosclerose?
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	**Medische opbrengsten:** Glomerulosclerose leidt tot chronische nierschade en is aanwezig bij bijna alle nierziekten, ongeacht hun oorzaak. In Nederland hebben 1,7 miljoen mensen chronische nierschade. Het is niet duidelijk wat de moleculaire processen zijn die glomerulosclerose en daardoor chronische nierschade veroorzaken. Onderzoek naar de mechanismen van glomerulosclerose is derhalve van groot belang. Dit project levert de volgende vernieuwende bijdragen: 1. Inzicht over de rol van glomerulaire endotheelcellen en EZH2 in het ontstaan van glomerulosclerose. 2. Ontwikkeling van nieuwe therapeutische benaderingen voor glomerulosclerose. **Wetenschappelijk en maatschappelijk belang:** Meer inzicht krijgen in de ontwikkeling van glomerulosclerose en de specifieke bijdrage van glomerulair endotheel hierin om op termijn een nieuwe behandelingsmethode mogelijk te maken.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	588 muizen
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	De muizen ontwikkelen glomerulosclerose door diabetes of acute proteïnurie. Dit veroorzaakt licht ongerief. De muizen krijgen injecties met een experimenteel middel, wat, afhankelijk van het aantal injecties, licht tot matig ongerief veroorzaakt.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Licht tot matig ongerief.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De muizen worden geëuthanaseerd in kader van het experiment. Hun organen en bloed worden verder bestudeerd in het laboratorium.

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 bestaat geen alternatief model voor de ontwikkeling van glomerulosclerose.
4.2	**Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Er wordt verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt door: 1. Statistische berekeningen vooraf 2. Pilot experiment 3. Stapsgewijze uitvoering van experimenten (tevoren vastgestelde go/no go beslismomenten)
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.	1. Een speciale muizenstam (BTBR obese muizen) ontwikkelt spontaan glomerulosclerose zoals bij de mens, in tegenstelling tot chemische modellen. Dit model bootst humane chronische glomerulosclerose het beste na. 2. Muizen van een andere muizenstam (anti-Thy 1.1) ontwikkelen door een injectie versneld proteïnurie en glomerulosclerose. Deze stam is geschikt om glomerulosclerose in een korte tijdspan te onderzoeken. Dit model is het meest specifiek in de ontwikkeling van acute proteïnurie en glomerulosclerose. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.
	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	In dit project worden de volgende humane eindpunten gehanteerd en gewaarborgd: - Gewichtsverlies van meer dan 20%. De dieren worden om de dag gewogen. - Extra ongerief door condities niet gerelateerd aan het experiment, zoals wondjes en infecties. Het welzijn wordt om de dag gecontroleerd. - Te hoog niveau bloedglucose door diabetes. Dit wordt wekelijks gemeten. - Te hoge totaal score voor kenmerken van algeheel ongerief, zoals activiteit, wassen, rillen en vachtstructuur. Het gedrag en welzijn wordt om de dag geobserveerd en bijgehouden. Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	
Beoordeling achteraf	
Andere opmerkingen	

4.

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.	10500
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen
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: Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project worden twee verschillende groepen muizen gebruikt: (a) BTBR$^{ob/ob}$ muizen en (b) BTBR$^{wt/wt}$ (erkende leverancier):

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (8-20 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

BTBR$^{ob/ob}$ muizen betreffen een model in de BTBR (black and tan, brachyuric) muis. Deze muizen hebben een ob/ob leptine-deficiëntie mutatie en ontwikkelen hierdoor diabetes mellitus type 2 (DMT2), waaronder hyperglycemie en insuline resistentie. Vanaf week 4 ontstaat proteïnurie en vanaf week 8 glomerulosclerose (GS), verlittekening van de filters in de nier (de glomeruli). Na 20 weken zijn glomerulaire laesies aanwezig, die vergelijkbaar zijn met humane GS in diabetische nefropathie. Er is gekozen voor dit model omdat de BTBR$^{ob/ob}$ muizen spontaan glomerulosclerose (GS) ontwikkelen, hetgeen de GS in de humane situatie het best reflecteert. BTBR$^{ob/ob}$ muizen ontwikkelen diabetische nefropathie met chronische GS in een relatief korte tijdsduur, waardoor dit model zeer geschikt is om de hieronder beschreven interventiestudie te toetsen in een (relatief) korte tijdspan. In de literatuur is het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel een gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om diabetische nefropathie en daarmee chronische GS te bestuderen. BTBR$^{wt/wt}$ wordt gebruikt als (niet-diabetische) controle voor BTBR$^{ob/ob}$.

[redacted]

[redacted]

Subonderdeel 1
Dit onderdeel heeft als doel de [redacted] biodistributie en de eventuele nier- en levertoxiciteit in diabetische nefropathie te bestuderen.

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt:
De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [redacted]), zoals hieronder beschreven:

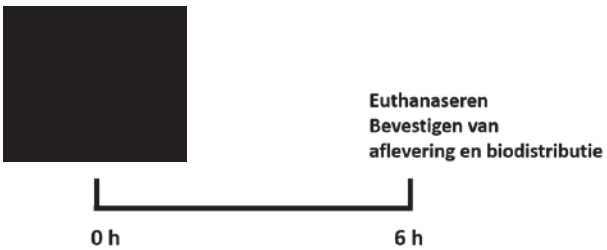
BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]

Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De groepen muizen worden 6 uur na de [redacted] geëuthanaseerd onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In het geïsoleerde bloed en weefsels wordt de [redacted], de bio-distributie en eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel zijn afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

[redacted]

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 2
Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 [redacted] worden bestudeerd:

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt:
De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [redacted]). De BTBR$^{ob/ob}$ controlegroepen ontvangen [redacted]), zoals hieronder beschreven:

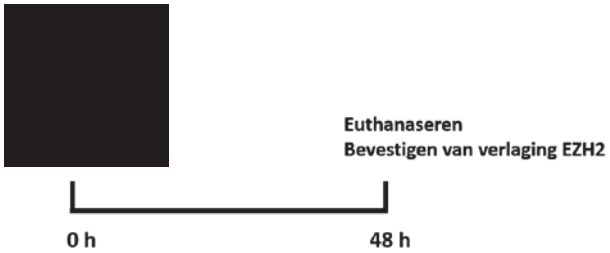
BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden hierbij opgedeeld in 4 verschillende groepen:
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]

- Behandeling met [redacted])

Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De muizen worden 48 uur na de [redacted] injectie geëuthanaseerd onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd of een verlaging van EZH2 in endotheelcellen plaatsvindt na behandeling met de verschillende soorten SOS.
Dit tijdspunt wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen ten opzichte van de controlegroepen die [redacted] hebben ontvangen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [redacted] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen te behandelen met als doel EZH2 chronisch (gedurende 4 weken) te verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen.
Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met niet-getargere EZH2 remmer uitgevoerd om EZH2 te verlagen. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Voor dit doeleinde worden zowel $BTBR^{ob/ob}$ als $BTBR^{wt/wt}$ muizen gebruikt. In de experimenten worden alle $BTBR^{ob/ob}$ groepen aan elkaar gematched aan de hand van de mate van proteinurie, leeftijd (8-20 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).
Gedurende 4 weken, worden $BTBR^{ob/ob}$ muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [redacted]. $BTBR^{wt/wt}$ zullen gedurende deze 4 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit [redacted]. De eerste injectie zal plaatsvinden wanneer de muizen tussen 8 weken en 20 weken oud zijn.
Naast de [redacted] groepen, wordt een groep $BTBR^{ob/ob}$ muizen gedurende 4 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrekkelijke dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep $BTBR^{ob/ob}$ muizen wordt gedurende 4 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De $BTBR^{ob/ob}$ muizen worden onderverdeeld in 7 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De BTBR$^{wt/wt}$ muizen worden behandeld met vehicle.

De BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden geïnjecteerd met [redacted] welke zich in 100 µl vloeistof bevinden. Het injecteren van vloeistof kan leiden tot hypervolume en derhalve nierschade veroorzaken. Aan het einde van het experiment zullen de nierfunctie waarden van de behandelde BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden vergeleken met de nierfunctiewaarden van BTBR$^{wt/wt}$ controle muizen. Mogelijke volume-afhankelijke veranderingen in nierfunctie kunnen worden gecontroleerd door de BTBR$^{wt/wt}$ muizen als vehicle-controle mee te nemen in het experiment.

[redacted] . Tevens zal na uitvoering van subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na uitvoering van subonderdeel 2 zal bekend zijn of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd. Als dit het geval is, betekent dit dat de gebruikte dosis in de subonderdelen 1 en 2 ook in dit subonderdeel 3 zal worden gehanteerd. Indien de gehanteerde dosis niet afdoende is, zal een 10-voudige dosis worden getoetst als beschreven in subonderdeel 2.
De betrekkelijke dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 4 weken zien er als volgt uit:
Op dag -7 (Zeven dagen vóór de eerste injectie met [redacted] zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie te kunnen vaststellen voor aanvang van het experiment. Aan de hand hiervan kan schade aan de glomeruli worden gemeten, wat zal worden vergeleken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment. Ook worden aan de hand van deze proteïnurie waarden op dag -7, de BTBR$^{ob/ob}$ muizen ingedeeld, waardoor de proteïnurie in iedere BTBR$^{ob/ob}$ groep gemiddeld gelijk is.
Op dag 0, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie met SOS of vehicle worden gegeven. De BTBR$^{ob/ob}$ muizen zijn zwaarder, waardoor bij deze muizen ongeveer 150µl zal worden afgenomen. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen wekelijks worden gemonitord in het bloed. De gezondheidsstatus van de dieren zal om de dag worden gemonitord aan de hand van gewicht en gedragsobservaties.
Iedere week, gedurende 4 weken (28 dagen), zal aan de muizen een injectie met [redacted] of vehicle worden toegediend (**op dag 0, dag 7, dag 14 en dag 21**) en zal bloed worden afgenomen door middel van het wondje in de staart door het knipje in de staart op dag 0.
Op dag 6 en 13 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen om op deze manier de ontwikkeling en progressie van GS gedurende de interventie te kunnen monitoren.
Op dag 27 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee kan worden bepaald of de [redacted] groep minder glomerulaire schade heeft na het targeten van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen gedurende 4 weken, ten opzicht van de andere experimentele groepen.
De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde BTBR$^{ob/ob}$ muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [redacted] Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 28 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE						
		Physical examina-tion	Body weight	Injection vehicle/ [redacted]	Blood collec-tion	Urine collectio n (metabo -lic cage 24h)	Harves t kidney + other organs	Weigh organs and fixation/freezing
TIME (days)	-7	X	X			X		
	-6	X	X					
	-5							
	-4	X	X					
	-3							
	-2	X	X					
	-1							
	0	X	X	X	X			
	1							
	2	X	X					
	3							
	4	X	X					
	5							
	6	X	X			X		
	7	X	X	X	X			
	8	X	X					
	9							
	10	X	X					
	11							
	12	X	X					
	13					X		
	14	X	X	X	X			
	15	X	X					
	16							
	17	X	X					
	18							
	19	X	X					
	20							
	21	X	X	X	X			
	22	X	X					
	23							
	24	X	X					
	25							
	26	X	X					
	27					X		

	28	**X**	**X**		**X**		**X**	**X**

Om de rol van EZH2 in het glomerulair endotheel tijdens GS te onderzoeken, wordt 4 weken als tijdspunt aangehouden, aangezien over een langere periode (4 weken) zal worden onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geïnhibeerd en/of gestopt. Op een vroeger tijdspunt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 4 weken worden alle muizen geëuthanaseerd, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren zal worden onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. [redacted]. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [redacted] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2 en eventueel een effect hebben gehad op de gevolgen van diabetes mellitus type 2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

1. Albumine-creatinine ratio (primaire uitleesparameter van nierfuntie)
2. Plasma glucose en insuline (als maat voor DMT2 in de muizen)
3. Urine glucose
4. Urine elektrolyten (als maat voor nierschade)
5. Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
6. Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
7. Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

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.

1. Spontane inductie van GS door genetische achtergrond in BTBR$^{ob/ob}$. Dit is in de literatuur een van de meest gangbare en gestandaardiseerde modellen voor diabetische nefropathie en daardoor chronische GS.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle of [redacted] gedurende 4 weken. [redacted]). Tevens zal na subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en –schade en de status van diabetes mellitus type 2 worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Gedurende 35 dagen zullen de muizen vier keer worden gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Voorafgaand aan huisvesting in metabole kooien wordt door middel van gedragsobservaties en lichaamsgewichtsbepaling vastgesteld dat de dieren in staat zijn een metabole kooi experiment te ondergaan.

5. Euthanaseren 28 dagen na eerste intraveneuze injectie, onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 28 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht.

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

Subonderdeel 1:
In dit experiment wordt de aflevering van de [redacted] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [redacted] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd om het aantal benodigde dieren te berekenen.
Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, [redacted] e stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen getargete en niet-getargete SOS. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 7%
- Effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen BTBR$^{ob/ob}$ ([redacted])) zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:
2 groepen x (n=10) = 20 BTBR$^{ob/ob}$ muizen

Subonderdeel 2:
Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse.
In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen vakgroep, waarbij ook [redacted] bevatten werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd. We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van [redacted]. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR$^{ob/ob}$ groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom n=6 muizen benodigd.
In totaal worden 4 groepen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt ([redacted]
4 groepen x (n=6) = 24 BTBR$^{ob/ob}$ muizen.

Subonderdeel 3:
Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.
Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in BTBR$^{ob/ob}$ muizen wordt de mate van albumine-creatinine ratio (ACR) aangehouden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR$^{ob/ob}$ een albumine-creatinine ratio hebben van gemiddeld 850 µg/mg en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680 µg/mg. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: BTBR$^{ob/ob}$ vehicle en BTBR$^{ob/ob}$ [redacted]
Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0,95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in ACR: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 BTBR$^{ob/ob}$ muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgegaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse.
Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de Albumine-Creatinine ratio die wordt gemeten in de urine.
We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Effect grootte in ACR = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle $BTBR^{ob/ob}$ groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.

In totaal worden 1 groep $BTBR^{wt/wt}$ en 7 groepen $BTBR^{ob/ob}$ gebruikt = 8 groepen.
8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 $BTBR^{wt/wt}$ muizen en 175 $BTBR^{ob/ob}$ muizen).

In totaal worden in dit deelproject maximaal gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 $BTBR^{ob/ob}$
- Subonderdeel 2: 24 $BTBR^{ob/ob}$
- Pilot: 50 $BTBR^{ob/ob}$
- Subonderdeel 3: 175 $BTBR^{ob/ob}$ en 25 $BTBR^{wt/wt}$

B. De dieren

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

In deze studie worden type $BTBR^{ob/ob}$ muizen gebruikt, welke door een leptine-deficiëntie mutatie diabetes mellitus type 2 (DMT2) ontwikkelen en daardoor diabetische nefropathie met chronische GS. Deze stam ontwikkelt spontaan GS, waardoor GS niet geïnduceerd hoeft te worden middels aanvullende interventie.
De achtergrond van deze muis is BTBR (black and tan, brachyuric). $BTBR^{wt/wt}$ muizen zijn dezelfde muisstam als $BTBR^{ob/ob}$, maar hebben geen leptine-deficiëntie mutatie in het genoom en daarom vanzelfsprekend geen DMT2, proteïnurie en GS, waardoor deze muis als (niet-diabetische) controle wordt gehanteerd.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, doordat de proteïnurie in de vrouwelijk $BTBR^{ob/ob}$ muizen niet stijgt, maar fluctueert tussen week 8 en week 16 (Hudkins et al, J American Soc Nephrol, 2010). Mannelijke muizen laten tot en met week 20 een stijging in proteïnurie zien. Doordat als primaire uitleesparameter proteïnurie (ACR) wordt gehanteerd, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere *n* aan muizen benodigd zou zijn. Daarom dat zullen in zowel subonderdeel 1, 2 als 3 mannelijke muizen worden gebruikt.

De leeftijd van de muizen voor het toedienen van de [redacted] is afhankelijk van de expressie van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen. Het is reeds bekend dat op een leeftijd van 24 weken, EZH2 significant is verhoogd in de glomerulaire endotheelcellen in $BTBR^{ob/ob}$ ten opzicht van $BTBR^{wt/wt}$. De [redacted] zullen worden toegediend op het moment dat een verhoging van EZH2 voor het eerst optreedt in $BTBR^{ob/ob}$ ten opzichte van controle dieren $BTBR^{wt/wt}$ of op de vroegst mogelijke leeftijd dat experimenten met de dieren mogelijk

is. Dit moet echter nog worden uitgezocht in weefsels van BTBR$^{ob/ob}$ dieren van verschillende leeftijden. Dit zal worden gedaan in archiefmateriaal in samenwerking met een onderzoeksgroep van de Universiteit van Heidelberg. Daarom zullen de [redacted] worden toegediend tussen de leeftijden 8 en 24 weken.

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
Voordat wordt begonnen aan deze dierstudie is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor [redacted]. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress.

Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld.
Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg. Verder is het gebruik van 'lagere' diersoorten niet mogelijk, aangezien de effecten van [redacted] met siRNA primair in het glomerulair endotheel worden onderzocht, waarbij de primaire uitleesparameter ACR is.

Verfijning
Het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel is het muismodel voor diabetische nefropathie dat spontaan glomerulosclerose ontwikkeld. Hierdoor hoeven de dieren niet worden geïnjecteerd met chemische middelen en ervaren hierdoor minder ongerief. Tevens ontwikkelen de muizen diabetische nefropathie in een relatief korte tijdsduur. Hierdoor kan de [redacted] interventie worden getest in een korte tijdspan, wat ook minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur.
Er wordt gekozen voor een dosis waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwacht dat geen toxiciteit en ongerief wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden om de dag gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden geëuthanaseerd.
Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.

Na bloedafname en injectie met [redacted] onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking.
De muizen worden om de dag gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt

over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

Vermindering
Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke geëuthanaseerd worden op het tijdspunt van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (4 weken ofwel 28 dagen).

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.

Nadat GS spontaan is ontwikkeld, kan de muis een ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: Vermeerderde eetlust/drinken, gewichtstoename. Om aan de vergrote eetlust te voldoen, zullen de dieren eten en drinken ad libitum krijgen.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.
De gebruikte [redacted] is afgeleid van subonderdelen 1 en 2 en studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde en gepubliceerde studies.
De muizen worden om de dag gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Indien nodig worden dieren eerder opgeofferd dan gepland op basis van bereikte humane eindpunten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

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?

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De niveaus van glucose worden wekelijks gemeten, om de status van de diabetes nauwkeurig in de gaten te houden.

De eetlust van de BTBR$^{ob/ob}$ dieren is verhoogd waardoor deze dieren meer gaan eten, gewichtstoename ondervinden en obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van. Voedsel zal ad libitum worden aangeboden, om te zorgen dat de muizen voldoende te eten hebben. De muizen zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze vakgroep, verwachten we geen nier- en levertoxiciteit van de dosis [redacted]

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden.

De eetlust van de BTBR$^{ob/ob}$ dieren is verhoogd waardoor obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen.

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

Ter verlichting van het lichte ongerief door de vermeerderde eetlust, zal voer ad libitum worden aangeboden in de kooi.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder

algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.
De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.
De dieren zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, [redacted] onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen wanneer een van de volgende omstandigheden zich aandienen:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

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

De muizen worden maximaal 35 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR$^{ob/ob}$ muizen verwacht.

In subonderdeel 2:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR$^{ob/ob}$ muizen verwacht.

In subonderdeel 3:
Er wordt in de groep BTBR$^{wt/wt}$ muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

K. Classificatie van ongerief

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

De mate van ongerief door de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie, glomerulosclerose is licht.
De mate van ongerief door de eenmalige [redacted] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [redacted] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.

Vier maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie en GS het gevolg is van de genetische achtergrond van de muizen. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [redacted] en het wondje in de staart door bloedafname.

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 groepen muizen zullen actief worden geëuthanaseerd 28 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren.
Hierin zullen belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

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.	10500
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project worden Thy1.1 muizen gebruikt (erkende leverancier), opgedeeld in 2 groepen: (a) met anti-Thy1.1 antilichamen behandeld voor inductie acute proteïnurie gevolgd door GS (anti-Thy1.1 muizen) (b) met niet-reactief IgG antilichamen behandeld (IgG muizen), als controle groep:

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

De anti-Thy1.1 muis staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarin zich acute proteïnurie ontwikkelt gevolgd door glomerulosclerose (GS). In de glomerulus, op de podocyten, van deze muis komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 60-80% van de glomeruli sclerose bevatten. Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan ontwikkelt en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Doordat een ontstekingsreactie gaande is in de glomeruli van Thy1.1 muizen die anti-Thy1.1 antilichamen

geïnjecteerd hebben gekregen, is het glomerulair endotheel geactiveerd/beschadigd en daardoor wordt het adhesie molecuul E-selectine tot expressie gebracht op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcel. [redacted]

Subonderdeel 1
Dit onderdeel heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] biodistributie en de eventuele nier-en levertoxiciteit in acute proteïnurie en GS te bestuderen:

In bijlage 1 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose onderzocht in het chronische BTBR$^{ob/ob}$ model. Deze muizen ontwikkelen glomerulosclerose door een genetische verandering. In de huidige bijlage wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose in het acute anti-Thy1.1 model onderzocht. Deze muizen worden geïnjecteerd met anti-Thy1.1 antistoffen waardoor glomerulosclerose ontstaat.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose in deze modellen door andere stimuli veroorzaakt wordt, kan de activatie van glomerulaire endotheelcellen verschillend kan zijn in beide modellen. [redacted] expressie wordt geanalyseerd in archiefmateriaal van anti-Thy1.1 muizen, alvorens het dierexperiment wordt gestart.
Naast een veranderde [redacted], kan de efficiëntie van targeting verschillend zijn in beide modellen door verstoorde bloedflow of een meer systemische activatie van het endotheel door de anti-Thy1.1 antistoffen.
Om een veranderde targeting vast te kunnen stellen is dezelfde workflow nodig in zowel bijlage 1 als bijlage 2.

Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:
Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren. De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [redacted] De anti-Thy1.1 controlegroep ontvangen [redacted] zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:
- Behandeling met E-selectine getargete SOS met daarin siRNA tegen EZH2 (E-sel-SOS-siEZH2)
- Behandeling met IgG-SOS-siEZH2 (niet getarget, wel siEZH2)

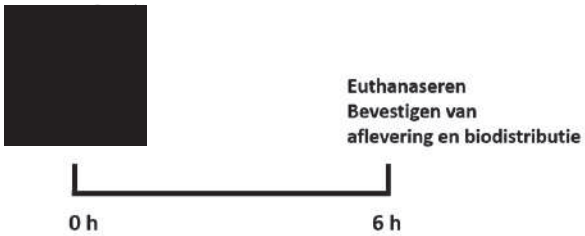
Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden gedood onder volledige anesthesie 6 uur na de [redacted] injectie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdspunt wordt gekozen om de aflevering van [redacted] aan het glomerulair endotheel te onderzoeken, ten opzichte van de aflevering van de [redacted] aan het glomerulair endotheel in de controlegroep die [redacted] heeft ontvangen. Deze experimentele groepen geven ons de mate van aflevering van de verschillende [redacted] die wordt vastgesteld in de glomeruli, maar ook in de lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta, hart en andere delen van de nier.
In de geïsoleerde bloed en weefsels wordt de aflevering van de [redacted] de bio-distributie en de eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. In de anti-Thy1.1 muizen zal de expressie van E-selectine op de glomerulaire endotheelcellen nog worden bepaald in archiefmateriaal alvorens het dierexperiment wordt uitgevoerd. In de glomeruli van dit muismodel vindt een ontstekingsreactie plaats, waardoor het zeer waarschijnlijk is dat de glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn en daardoor E-selectine tot expressie brengen op het celmembraan. De glomerulaire endotheelcellen worden getarget met behulp van [redacted] wordt afgeleverd

aan de glomerulaire endotheelcellen. [redacted] Deze lokalisatie van anti-E-selectine antilichamen wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel, en is eerder met succes uitgevoerd ([redacted]

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 2
Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted] worden bestudeerd:

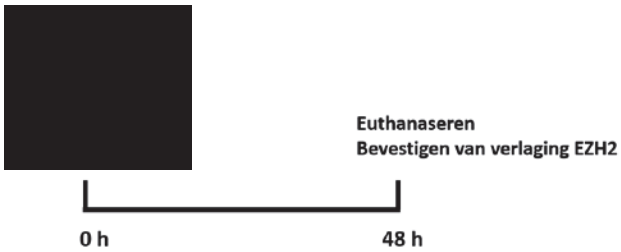
Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:
Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren.
De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [redacted]. De anti-Thy1.1 controlegroepen ontvangen [redacted] zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden hierbij onderverdeeld in 4 verschillende groepen:
- Behandeling met [redacted]-[redacted]
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted])

Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden geëuthanaseerd 48 uur na de [redacted] injectie onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdspunt wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligt ten opzichte van de controlegroepen die [redacted] hebben ontvangen. In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd wat de verlaging van EZH2 in endotheelcellen is na de behandeling met de verschillende soorten [redacted] In de glomeruli in de nieren zal worden bepaald of de [redacted] specifiek EZH2 verlaagt in de glomerulaire endotheelcellen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [redacted]-[redacted]) om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen gedurende 2 weken te behandelen met als doel EZH2 te verlagen in glomerulaire endotheelcellen.

Voor dit doeleinde worden zowel anti-Thy1.1 muizen als IgG muizen gebruikt. In de experimenten worden alle anti-Thy1.1 groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd). Op de leeftijd van 5 weken worden de anti-Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren, of de muizen worden onderworpen aan een injectie met niet-reactieve IgG antistoffen als controle groep. Vanaf de dag er na worden de muizen gedurende 2 weken behandeld met [redacted] of vehicle. Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met een niet-getargete EZH2 remmer om EZH2 te verlagen uitgevoerd nadat acute proteïnurie en GS zijn geïnduceerd. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Gedurende 2 weken, worden anti-Thy1.1 muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [redacted], [redacted]). IgG muizen zullen gedurende deze 2 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit HEPES en NaCl, pH 6,7. [redacted] De eerste injectie van [redacted] of vehicle zal 1 dag na de injectie met anti-Thy1.1 of IgG antilichamen worden toegediend. Naast de [redacted] groepen, wordt een groep anti-Thy1.1 muizen gedurende 2 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrekkelijke dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep anti-Thy1.1 muizen wordt gedurende 2 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De anti-Thy1.1 muizen worden opgedeeld in 5 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [redacted]-[redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met farmacologische small molecule inhibitor van EZH2
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De IgG muizen worden behandeld met vehicle.

De benodigde dosis van [redacted] en siRNA is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in [redacted]). Tevens is na deelproject 1 en subonderdeel van huidig deelproject bekend of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 bewerkstelligt, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in dit deelexperiment zal worden gehanteerd.
De betrekkelijke dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 2 weken zien er als volgt uit:
Op dag -1 worden de muizen onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 of niet-reactieve IgG antilichamen. De muizen zullen hierna gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie te kunnen vaststellen aan het begin van het experiment. Aan de hand hiervan kunnen we schade aan de glomerulus meten en vergelijken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment.
Op dag 0, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie

met [redacted] of vehicle worden gegeven. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen worden gemonitord in het bloed. De dieren zullen om de dag worden gecontroleerd op gewicht en welzijn. Iedere week, gedurende 2 weken (14 dagen), zal aan de muizen een injectie met [redacted] of vehicle worden toegediend (**op dag 0 en dag 7**) en zal bloed (100µl/25 gram lichaamsgewicht/7 dagen) worden afgenomen door middel van het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0.
Op dag 6 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen gedurende de interventie.
Op dag 13 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als meter voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee wordt bepaald of de [redacted] groep minder glomerulaire schade heeft na 2 weken van EZH2 targeting in de glomerulaire endotheelcellen, ten opzicht van de andere experimentele groepen.
De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde anti-Thy1.1 muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [redacted] Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 14 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE							
		Physical examina-tion	**Body weight**	**Injec-tion anti-Thy1.1 / IgG**	**Injec-tion vehicle/ [redacted] of inhibi-tor/ve-hicle**	**Blood collec-tion**	**Urine collect-ion (meta-bolic cage 24h)**	**Harvest kidney + other organs**	**Weigh organs and fixation/ freezing**
TIME (days)	**-1**	**X**	**X**	**X**			**X**		
	0	**X**	**X**		**X**	**X**			
	1	**X**	**X**						
	2								
	3	**X**	**X**						
	4								
	5	**X**	**X**						
	6						**X**		
	7	**X**	**X**		**X**	**X**			
	8	**X**	**X**						
	9								
	10	**X**	**X**						
	11								
	12	**X**	**X**						
	13						**X**		
	14	**X**	**X**			**X**		**X**	**X**

Om de rol van EZH2 in glomerulair endotheel te onderzoeken, wordt 2 weken als tijdspunt aangehouden, aangezien over een langere periode (2 weken) wordt onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geremd en/of gestopt. Op een vroeger tijdspunt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 2 weken worden alle muizen geëuthanaseerd, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren wordt onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. In de lever, milt en longen wordt onderzocht of hierin veel [redacted] terecht zijn gekomen, aangezien in deze organen veelal liposomen, zoals [redacted] kunnen ophopen. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [redacted] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

- Albumine-creatinine ratio (uitleesparameter van nierfuntie)
- Urinair elektrolyten (als maat voor nierschade)
- Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
- Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
- Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

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.

1. Inductie van acute proteïnurie gevolgd door GS door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antilichamen.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle, [redacted]) gedurende 2 weken. De benodigde dosis van SOS en siRNA wordt bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in [redacted]. Tevens zal na deelproject 1 en subonderdeel 1 van huidig deelproject bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 van huidig deelproject is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en –schade worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Muizen worden 3 keer gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Echter, de dieren worden alleen 3 keer in de metabole kooi gehuisvest wanneer de dieren vitaal genoeg zijn.

5. Euthanaseren 14 dagen na eerste intraveneuze injectie met [redacted] onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 14 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht in dit acuut model.

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

Subonderdeel 1:
In dit experiment wordt de aflevering van de [redacted] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [redacted] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd, om het aantal benodigde dieren te berekenen.
Aan de hand van gepubliceerde studies, [redacted] Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is. Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 7%
- Gewenste effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen anti-Thy1.1 muizen ([redacted])). Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:
2 groepen x (n=10) = 20 anti-Thy1.1 muizen

Subonderdeel 2:
Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse.
In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook E-selectine getargete [redacted] die siRNA bevatten werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd.
We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van [redacted]. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom n=6 muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt ([redacted]-[redacted]
4 groepen x (n=6) = 24 anti-Thy1.1 muizen.

Subonderdeel 3:
Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.
Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in anti-Thy1.1 muizen wordt de mate van glomerulosclerose aangehouden. Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 71% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8% Wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: anti-Thy1.1 vehicle en [redacted]-[redacted]
Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0,95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in glomerulosclerose: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 anti-Thy1.1 muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgegaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de effecten en therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de mate van glomerulosclerose die wordt gemeten

in de nier weefsels.
We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Gewenste effect grootte = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.
In totaal worden 1 groep IgG muizen en 7 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt = 8 groepen
8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 IgG muizen en 175 anti-Thy1.1 muizen).

In totaal wordt in dit deelproject gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 2: 24 anti-Thy1.1 muizen
- Pilot: 50 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 3: 175 anti-Thy1.1 en 25 IgG muizen

B. De dieren

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

In deze studie worden anti-Thy1.1 muizen gebruikt, welke model staan voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarin zich acute proteïnurie en GS ontwikkelen. In de glomerulus, op de podocyten van deze stam komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 71% van de glomeruli sclerose bevatten. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan wordt ontwikkeld en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, om de hormonale invloeden in vrouwelijke muizen op het ziekteproces te minimaliseren. In dit project zou het gebruik van vrouwelijk muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere *n* aan muizen benodigd zou zijn. Daarom zullen in zowel subonderdeel 1, 2 en 3 mannelijke muizen worden gebruiken.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging
Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor E-selectine tot expressie werd gebracht op het celmembraan, waarna ze zijn blootgesteld aan [redacted]. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress. Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.

Verfijning
Het anti-Thy1.1 muismodel staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarbij acute proteïnurie en GS optreden. Anti-Thy1.1 muizen ontwikkelen door een eenmalige injectie versnelde proteïnurie en glomerulosclerose. Hierdoor kan de [redacted] interventie worden getest in een korte tijdspan, wat minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur in andere modellen.
Er wordt gekozen voor een dosis van siRNA en [redacted] waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwachten dat geen toxiciteit wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden om de dag gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden geëuthanaseerd.
Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.
Na bloedafname en injectie met [redacted] onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking.
De muizen worden om de dag gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

Vermindering
Voordat het experiment wordt begonnen, zal allereerst worden berekend hoeveel muizen er nodig zijn per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten van het experiment (poweranalyse). Dit aantal dieren zal worden geïncludeerd. Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke gedood worden op het tijdspunt van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (2 weken ofwel 14 dagen).

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.

Nadat GS is geïnduceerd door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, kan de muis licht ongerief ervaren. Ter verlichting van het ongerief als gevolg van bloedafname en toediening van [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, ontvangen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.
De gebruikte [redacted] en siRNA dosis is afgeleid uit deelproject 1, studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde

en gepubliceerde studies.
De muizen worden om de dag gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van het CDP. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt.

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.

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

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?

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De muizen zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole kooi te worden gehuisvest.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van deelproject 1 en eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze onderzoeksgroep, wordt geen nier- en levertoxiciteit van de [redacted].

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS en zullen hierdoor licht ongerief ondervinden.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen.

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

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de SOS of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

De dieren zullen om de dag worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en geëuthanaseerd.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, [redacted] onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen. Daarnaast blijven de muizen maximaal 15 dagen in het experiment.

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

De muizen worden maximaal 15 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 2:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 3:
Er wordt in de groep IgG muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

K. Classificatie van ongerief

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

De mate van ongerief door de ontwikkeling van proteïnurie en GS is licht.
De mate van ongerief door de eenmalige anti-Thy1.1 en [redacted] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [redacted] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.
Drie maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van proteïnurie en GS het gevolg is van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 injectie. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [redacted] en het wondje in de staart door bloedafname.

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 groepen muizen zullen actief worden geëuthanaseerd 14 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren.
Hierin zullen belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

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

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

☒ Ja

6.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer Interne RUG code **8103**

2. Titel van het project: **De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie?**

3. Titel van de NTS: **Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen.**

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

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

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
   ☐ ontvangen door DEC: **01-06-2017**
   ☐ aanvraag compleet: **01-06-2017**
   ☐ in vergadering besproken: **08-01-2017**
   ☐ anderszins behandeld: **15-08-2017**
   ☐ termijnonderbreking(en) van / tot **13-06-2017 tot 25-07-2017**
   ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
   ☐ aanpassing aanvraag: **25-07-2017**
   ☐ advies aan CCD: **25-08-2017**

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

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

9. Correspondentie met de aanvrager
   Datum: **13-06-2017**
   Opmerkingen/vragen
   - ***T.a.v.het projectvoorstel:***
   - 1/ Het project wordt aangemerkt als fundamenteel/translationeel. Het lijkt toch vooral fundamenteel omdat hier EHH2 als mechanisme onderzocht wordt.

- ***T.a.v.bijlage 1:***
- 2/ Deel 1: Hoe wordt eigenlijk bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel zijn afgeleverd?
- 3/ t.a.v. Deel 3: Kunnen de aanvragers beter onderbouwen wat de toegevoegde waarde van de vehicle geïnjecteerde wildtype muizen in het design is?
- 4/Onder 'J. humane eindpunten', staat: *'Er wordt niet meer uitval dan 16% in ……. muizen verwacht'* (voor subonderdeel 1, 2 en 3). Waar komt die 16% vandaan?
- ***T.a.v.bijlage 2:***
- 5/ Waarom wordt dezelfde workflow als in bijlage 1 weer gevolgd? Waarom moet bv deel 1 -targeting van [redacted] receptoren op Glomeruli- opnieuw uitgezocht worden? Dit is toch ook al bepaald in bijlage 1, deel1? Is het te verwachting dat de thy1.1 muizen zich totaal anders gedragen?
- 6/ Onder 'J. humane eindpunten', staat: *'Er wordt niet meer uitval dan 16% in ……. muizen verwacht'* (voor subonderdeel 1, 2 en 3). Waar komt die 16% vandaan?
- ***T.a.v. de proefopzet/statistiek:***
- 7/ Op zich wordt heel netjes vermeld dat een power analyse gedaan wordt om het daadwerkelijk benodigde aantal dieren goed in te kunnen schatten, maar nergens is te zien dat er extra dieren worden gereserveerd om dat te doen. Het lijkt de DEC dat men voor beide bijlagen een pilot voorafgaande aan subonderdeel 1 zou moeten doen om een indicatie van de effect size te krijgen?
- 8/ Verder vindt de DEC de n=25 vrij lastig te volgen aangezien er vrij weinig parameters in het stuk gedefinieerd zijn. Het is op dit moment niet in te schatten of dit een realistisch aantal is, zonder meer details in een rekenvoorbeeld te zien.
- 9/ Een additionele opmerking over subonderdeel 3: dat is het tussentijds her bepalen van de power/sample size. De DEC ziet het liefst zo min mogelijk tussentijdse analysis en zou zeker niet op basis van n=3 de sample size opnieuw berekenen. Dat lijkt ook niet nodig: uit de voorafgaande experimenten zou redelijk duidelijk te bepalen moeten zijn wat de sample size moet zijn.
- 'Mean + StDev' in de controle groep is bekend uit eerdere experimenten. 'Mean' van de test groep volgt uit het minimale relevante effect. Enige wat onbekend is, is de variantie in de experimentele groep. Daar zal een assumptie voor gedaan moeten worden.
- 10/ Er zit nog 1 onvolkomenheid in bijlage 2, waarbij eerst met n=6 wordt gerekend (subonderdeel 1) wat later weer n=10 blijkt te zijn. De DEC neemt aan dat dit ook n=10 moet zijn. Verder zou nog de beoogde power en alpha toevoegd moeten worden.
-
- Datum antwoord: **25-07-2017**
- Verstrekt(e) antwoord(en):

1/ In dit project wordt de bijdrage van EZH2 aan de ontwikkeling en progressie van glomerulosclerose onderzocht alsook de mechanismen wordt geprobeerd te identificeren waarbinnen EZH2 een belangrijke rol speelt. Deze kennis is voornamelijk fundamenteel. De uitkomsten van deze studie kunnen mogelijk leiden tot meer translationele vervolgaanvragen. Derhalve nemen we het advies van de DEC over om dit project enkel als fundamenteel onderzoek aan te duiden.

2/ Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. We hebben reeds vastgesteld in het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel voor diabetische glomerulosclerose dat E-selectine tot expressie komt op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcellen. In dit project worden de glomerulaire endotheelcellen getarget met behulp van [redacted] aan de glomerulaire endotheelcellen kan worden vastgesteld door de E-selectine antilichamen aan te tonen in de weefsels van de BTBR$^{ob/ob}$ muizen. Deze lokalisatie van anti-E-selectine antilichamen wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel, en is eerder met succes uitgevoerd [redacted]

3/In dit project zullen muizen worden geïnjecteerd met [redacted], welke zich in vloeistof bevinden. Het injecteren van vloeistof kan echter leiden tot hypervolume en derhalve nierschade veroorzaken. Aan het einde van het experiment zullen de nierfunctie waarden van de behandelde BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden vergeleken met de nierfunctiewaarden van BTBR$^{wt/wt}$ controle muizen. Mogelijke volume-afhankelijke veranderingen in nierfunctie kunnen we controleren door de BTBR$^{wt/wt}$ als vehicle controle mee te nemen in het experiment.

4/ In bijlage 1 van huidig project zullen BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden gebruikt. Uit eerdere studies binnen het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel is gebleken dat de uitval varieert tussen 10-15%. Om op hele aantallen muizen uit te komen voor de uitval, werd 16% aangehouden in plaats van 15%. Om uit te gaan van percentages in plaats van aantallen, wordt derhalve 15% aangehouden. [redacted]. Daarom wordt binnen alle experimentele groepen een uitval van maximaal 15% verwacht. Naast de uitval van de BTBR$^{ob/ob}$ muizen, is tevens de uitval van de BTBR$^{wt/wt}$ controle muizen aangepast. Een muis kan ziek worden door toeval of door een kooigenoot aangevallen worden en gewond raken. Onder deze omstandigheden zal een muis daarom uit de proef moeten worden genomen. Om deze reden wordt de uitval van BTBR$^{wt/wt}$ muizen geschat op 0-5%.

5/ In bijlage 1 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose onderzocht in een chronische model, namelijk BTBR$^{ob/ob}$ muismodel. Deze muizen ontwikkelen glomerulosclerose door een genetische verandering. In bijlage 2 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose in een acuut model onderzocht, namelijk het anti-Thy1.1 muismodel. Deze muizen worden geïnjecteerd met anti-Thy1.1 antistoffen waardoor glomerulosclerose ontstaat.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose in deze modellen door andere stimuli veroorzaakt wordt, kan de activatie van glomerulaire endotheelcellen verschillend kan zijn in beide modellen. Dit kan een andere expressie van E-selectine op het glomerulaire endotheel ten gevolge hebben, waardoor de targeting anders kan zijn.

Naast een veranderde E-selectine expressie, kan de efficiëntie van targeting anders zijn in beide modellen door verstoorde bloedflow of een meer systemische activatie van het endotheel door de anti-Thy1.1 antistoffen.

Om een veranderde targeting vast te kunnen stellen is dezelfde workflow nodig in zowel bijlage 1 als bijlage 2.

De aflevering van [redacted] is te relateren aan de mate van E-selectine expressie. De E-selectine expressie kan model-afhankelijk zijn waardoor de targeting voor ieder model moet worden uitgezocht.

6/ In bijlage 2 van huidig project zullen anti-Thy1.1 muizen worden gebruikt. Uit eerdere studies binnen het anti-Thy1.1 muismodel is gebleken dat de uitval varieert tussen 10-15%. Om op hele aantallen muizen uit te komen voor de uitval, werd 16% aangehouden in plaats van 15%. Om uit te gaan van percentages in plaats van aantallen, wordt derhalve 15% aangehouden. [redacted] Daarom wordt binnen alle experimentele groepen een uitval van maximaal 15% verwacht.

Naast de uitval van de anti-Thy1.1 muizen, is tevens de uitval van de IgG controle muizen aangepast. Een muis kan ziek worden door toeval of door een kooigenoot aangevallen worden en gewond raken. Onder deze omstandigheden zal een muis daarom uit de proef moeten worden genomen. Om deze reden wordt de uitval van IgG muizen geschat op 0-5%.

7/ Wij zijn het eens dat een pilot een goede manier is om een indicatie van de effect size te krijgen. Voor een pilot moet echter bekend zijn of de SOS aan de glomerulaire endotheelcellen worden afgeleverd en of een verlaging van EZH2 wordt bewerkstelligd.

Subonderdeel 1 heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] te bestuderen. In subonderdeel 2 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted]. Subonderdeel 3 heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [redacted] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens glomerulosclerose te onderzoeken. Subonderdeel 3 kan alleen worden uitgevoerd wanneer bekend is dat [redacted] specifiek worden afgeleverd aan de glomerulaire endotheelcellen én deze een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen.

Daarom is het essentieel eerst subonderdelen 1 en 2 uit te voeren, waarna een pilot wordt uitgevoerd als basis voor een powerberekening van subonderdeel 3. Voor het uitvoeren van deze pilot zijn extra dieren nodig, zoals hieronder omschreven:

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groepen muizen per bijlage: BTBR$^{ob/ob}$ vehicle en BTBR$^{ob/ob}$ [redacted] voor bijlage 1. Anti-Thy1.1 vehicle en anti-Thy1.1 [redacted] voor bijlage 2.

Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in BTBR$^{ob/ob}$ muizen wordt de albumine-creatinine ratio aangehouden. In anti-Thy1.1 muizen wordt als primaire uitkomstmaat de mate van glomerulosclerose aangehouden.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR$^{ob/ob}$ een albumine-creatinine ratio (ACR) hebben van gemiddeld 850 µg/mg en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680 µg/mg . We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 71% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8% wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0,95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in ACR/glomerulosclerose: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 BTBR$^{ob/ob}$ muizen**. In totaal worden in bijlage 2 2 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 anti-Thy1.1 muizen.**

8/ In diabetische nefropathie is de belangrijkste klinische parameter de albumine-creatinine ratio (ACR). Derhalve is dit de parameter die als primaire uitkomstmaat wordt aangehouden in dit project. Andere readouts zijn onder andere blood urea nitrogen, urine elektrolyten en plasma NGAL en KIM-1. Deze readouts worden echter als secundair eindpunt gebruikt.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR$^{ob/ob}$ een albumine-creatinine ratio (ACR) hebben van 850 µg/mg en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680 µg/mg. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.
In het anti-Thy1.1 muismodel voor acute proteïnurie en glomerulosclerose wordt als primaire uitkomstmaat de mate van glomerulosclerose aangehouden. Ook in bijlage 2, betreffende het experiment met dit muismodel, worden onder andere ook blood urea nitrogen, urine elektrolyten en plasma NGAL en KIM-1 gemeten. Deze readouts worden echter als secundair eindpunt gebruikt.
Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 70% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8 wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Effect grootte in ACR/glomerulosclerose = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR$^{ob/ob}$ groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 1 groep BTBR$^{wt/wt}$ en 5 groepen BTBR$^{ob/ob}$ gebruikt = 6 groepen

In totaal worden 1 groep BTBR$^{wt/wt}$ en 5 groepen BTBR$^{ob/ob}$ gebruikt = 6 groepen.

6 groepen x (n=25) = 150 muizen (25 BTBR$^{wt/wt}$ muizen en 125 BTBR$^{ob/ob}$ muizen).

n totaal worden 1 groep IgG-muizen en 5 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt = 6 groepen.

6 groepen x (n=25) = 150 muizen (25 IgG muizen en 125 anti-Thy1.1 muizen)

De aangepaste passages in de CCD aanvraag omtrent de hierboven beschreven poweranalyse voor subonderdeel 3, kunt u vinden in de beantwoording van opmerking 7.
9/In huidig project worden 3 subonderdelen gehanteerd. Subonderdeel 1 heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] te bestuderen. In subonderdeel 2 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted] onderzocht. Subonderdeel 3 heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [redacted] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens glomerulosclerose te onderzoeken. Subonderdeel 3 kan alleen worden uitgevoerd wanneer bekend is dat [redacted] specifiek worden afgeleverd aan de glomerulaire endotheelcellen én deze een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen.
Naar aanleiding van opmerking 7 is besloten dat het essentieel is een pilot experiment uit te voeren om de sample size te kunnen berekenen middels een poweranalyse. Deze pilot zal daarom worden uitgevoerd voordat subonderdeel 3 wordt gestart en nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zodat de aflevering van [redacted] en verlaging van EZH2 door [redacted] zijn vastgesteld in glomerulaire endotheelcellen. De pilot wordt gebruikt als basis voor een powerberekening voor het benodigde aantal dieren in subonderdeel 3, waardoor geen interim analyse wordt uitgevoerd.

De in de CCD aanvraag ingevoegde passages voor het pilot experiment, kunt u vinden in de beantwoording van opmerking 7. De passages waarin de interim analyse was beschreven, zijn verwijderd uit de CCD aanvraag.
10/ In subonderdeel 1 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] bestudeerd. Het aantal muizen voor dit subonderdeel wordt geschat op maximaal 10 muizen per groep.
Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook [redacted] werden gebruikt, werd een verschil van 70% in aflevering geobserveerd tussen [redacted]. We stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen [redacted]. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 7%
- Effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen BTBR$^{ob/ob}$ [redacted] zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

groepen x (n=10) = 20 BTBR$^{ob/ob}$ muizen

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen anti-Thy1.1 [redacted]) zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:

2 groepen x (n=10) = 20 anti-Thy1.1 muizen

In subonderdeel 2 wordt de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted] onderzocht. We willen minimaal 50% reductie bereiken in expressie van EZH2. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de SD 25% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR$^{ob/ob}$ en anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep is daarom n=6 muizen benodigd.
In totaal worden 4 groepen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt [redacted] -
[redacted] -
[redacted]

4 groepen x (n=6) = 24 BTBR$^{ob/ob}$ muizen.

In totaal worden 4 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt [redacted]

4 groepen x (n=6) = 24 anti-Thy1.1 muizen.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning. **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 *(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. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC 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 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 de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. *Mochten de DEC-RUG 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. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld)*.

Het directe doel van dit project is om kennis te vergaren over de invloed van epigenetische regulatie d.m.v. Enhancer of Zeste homolog 2 op de ontwikkeling van glomerulosclerose.

Het uiteindelijke doel is om de vergaarde kennis toe te passen in de behandeling of preventie van glomerulosclerose bij nierziekten en/of nierschade.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel onderzoek m.b.t. het hierboven beschreven (directe) doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project zijn de proefdieren, en mensen.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan voornamelijk als gevolg het toedienen van diverse substanties en het huisvesting in metabole kooien. Aan het einde van de proef zullen de dieren opgeofferd worden.

Waarden die voor mensen bevorderd worden: Er wordt nieuwe kennis vergaard over de rol van EZH2 in glomeruloscleruse. Deze kennis is nodig voor het begrijpen van deze processen Op de lange termijn kan dit mogelijk leiden tot de ontwikkeling van behandelingen voor deze aandoening, waardoor gezondheid en kwaliteit van leven van mensen verbeterd worden.

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 de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort. *Mochten de DEC-RUG 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. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).*
Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output 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. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6)*. **De DEC ziet geen reden om aan te nemen dat het projectvoorstel niet aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten. Het project bevat geen hiaten die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC 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 *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).* ***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 heeft zich ervan verzekerd dat huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2)*. **Dit lijkt realistisch ingeschat. De DEC 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. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2). (zie bijlage I voor voorbeeld).* **De integriteit van het dier wordt aangetast door het induceren van nierfalen, het toedienen van stoffen en opoffering.**

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

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*. **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor het onderzoeken van epigenetische regulatie mechanismen in de context van glomerulosclerose zijn in vitro of ex vivo niet na te bootsen.**

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

de mening van de DEC 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 de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties en power analyses.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3)*. **De DEC 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.**

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

Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld).* **In onderhavige projectaanvraag wordt gebruik gemaakt van mannelijke muizen omdat de variatie in de relevante uitleesparameters veel groter is in vrouwelijke muizen. De aanvrager heeft naar de mening van de DEC voldoende onderbouwd waarom in dit project alleen mannelijke muizen gebruikt worden.**
Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd *(Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).* **Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager. Dieren worden gedood om weefsels en te kunnen uitnemen en bestuderen, dit is een essentieel voor het beantwoorden van de vragen in dit project. De dieren worden gedood volgens een in bijlage 4 vermelde dodingsmethode.**

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 is zulks het geval.

D. Ethische afweging

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project **'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie?'**, Dat zich erop richt om in muizen kennis te vergaren over de rol van epigentische regulatie d.m.v. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) in het ontstaan van glomerulosclerose, het lichte tot matige ongerief dat de proefdieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **licht tot matig ongerief.**
Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **mogelijk substantieel voordeel.**

De DEC-RUG is van mening dat in het project **'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie??'** de belangen van de samenleving zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd. De betrokken proefdieren zullen in dit project licht en in sommige gevallen matig ongerief ondervinden, gevolgd door opoffering. Zij worden in hun welzijn geschaad door het induceren van nierfalen, het toedienen van stoffen middels injecties en huisvesting in metabole kooien, gevolgd door opoffering worden aangetast.

Glomerulosclerose (GS) is littekenvorming op de glomeruli in de nieren. GS kan onstaan bij diverse nieraandoeningen en draagt bij aan nierfalen. Dit project beoogt de rol van het enzym EZH2 in glomerulosclerose te onderzoeken. De aanvragers hebben eerder al laten zien dat EZH2 expressie in glomerulaire endotheelcellen verhoogd is bij GS. EZH2 zorgt voor epigenetische regulatie van genexpressie van genen die betrokken zijn bij de functie van endotheelcellen. De hypothese is dat een verhoogd EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen de ontwikkeling en progressie van zowel chronische GS als acute GS veroorzaakt hetgeen leidt tot proteïnurie. In dit project wordt deze hypothese getoetst door de expressie van EZH2 (in de glomeruli) te blokkeren/verminderen door het toedienen van interference RNA (Si-RNA) tegen EZH2 in twee muismodellen. 1) een chronisch model voor GS(De BTBRob/ob muis) en 2 een acuut model voor GS en proteïnurie (Thy1.1 muizen behandeld met anti-Thy1.1 antilichamen).

Nierfalen (als gevolg van GS) in mensen zorgt voor veel problemen, en vermindering van kwaliteit van leven. Een goede behandeling is er op dit moment nog niet. Het vergaren van kennis over EZH2 als aangrijpingsmechanisme voor een mogelijke behandeling is daarom nuttig en kan in de toekomst leiden tot de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor GS. De aanvragers hebben een trackrecord in dit onderzoeksveld en ervaring met de voorgestelde methoden en diermodellen. Naar de mening van de DEC is de kans op succesvolle uitvoering van het voorgestelde onderzoek groot. De wetenschappelijke en in het verlengde daarvan wellicht maatschappelijke opbrengsten zijn goed omschreven en wegen naar het oordeel van de DEC op tegen het aantal dieren dat gebruikt gaat worden en het lichte ongerief dat de dieren zal worden aangedaan. Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht.

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie?'**, het lichte tot matige ongerief, gevolgd door opoffering, dat de dieren wordt aangedaan, in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG 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-RUG is van mening dat de voorgestelde

experimentele opzet en uitkomstparameters 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. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering verfijning en vervanging. Dit blijkt onder andere uit de uitgebreide implementatie van go no-go momenten, uitvoering van pilot experimenten en het gebruik van weefsels uit bestaande bio-banken waar mogelijk. De DEC-RUG 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-RUG het voorgestelde project [redacted]', als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RUG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

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. 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 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 zijn geen grote knelpunten naar voren gekomen bij het beoordelen van deze aanvraag.

   De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.

Centrale Commissie Dierproeven

7.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
[redacted]
A. Deusinglaan 1 [redacted]
9713 AV GRONINGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1050020173184
Bijlagen
2

Datum 28 augustus 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2017. Het gaat om uw project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1050020173184. 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:
28 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

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:
28 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	10500
Naam instelling of organisatie:	Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[redacted]
KvK-nummer:	1179037
Straat en huisnummer:	A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats:	9713 AV GRONINGEN

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
28 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum:	1 augustus 2017
Geplande einddatum:	1 juni 2022
Titel project:	De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie
Titel niet-technische samenvatting:	Onderzoek naar de rol van het eiwit EZH2 in het ontstaan van nierfalen
Naam DEC:	DEC-RUG
Postadres DEC:	A. Deusinglaan 1, [redacted]
E-mailadres DEC:	[redacted]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Datum:
28 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

Ondertekening

Naam:	[redacted]
Functie:	[redacted]
Plaats:	Groningen
Datum:	25 augustus 2017

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
[redacted]
A. Deusinglaan 1, [redacted]
9713 AV GRONINGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1050020173184

Bijlagen
2

Datum 28 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 28 augustus 2017
Vervaldatum: 27 september 2017
Factuurnummer: 173184

Omschrijving	**Bedrag**
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1050020173184	€ 1.287,00

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

8.

[redacted]

Van: [redacted]
Verzonden: woensdag 13 september 2017 11:44
Aan: Info-zbo
CC: [redacted]
Onderwerp: RE: vragen bij de behandeling van AVD1050020173184
Bijlagen: 2017-09-13 NTS.docx; 2017-09-13 bijlage_DP2_Thy1.1 model.docx; 2017-09-13 bijlage_DP1_BTBR model.docx; 2017-09-13 Antwoorden op vragen CCD.docx

Categorieën: Dossier: [redacted] Dossier: [redacted]

Geachte [redacted],

Op 30 augustus j.l. stuurde u onderstaande mail met vragen van de CCD op mijn ingediende aanvraag.
Hierbij stuur ik u de antwoorden en aangepaste passages én de aangepaste documenten. Alle documenten zijn bijgevoegd in de bijlage.

Vriendelijk groet,
[redacted]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: woensdag 30 augustus 2017 16:40
Aan: [redacted]
CC: [redacted]
Onderwerp: vragen bij de behandeling van AVD1050020173184

Geachte [redacted],
U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend en bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen. Het betreft uw project: 'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie' met aanvraagnummer AVD1050020173184.
Kunt u meer inzicht geven welk aantal dieren welk ongerief zullen ondervinden? Wij komen uit op 15% licht en 85% matig. Is dit correct?
Onder punt L. in de bijlagen beschrijft u alleen de dieren die langer in proef zitten, niet de dieren die na 6 of 48 uur gedood worden.
In de NTS staat dat de dieren om de dag worden gecontroleerd. Het is verplicht dit dagelijks te doen.
Kunt u de beschrijving van de 3V's in de NTS meer aansluiten op de 3V's in het projectvoorstel? U doet bijvoorbeeld werk in celkweken, dat staat niet in de NTS genoemd.
Kunt u de aangepaste formulieren aan ons toesturen voor 15 september?
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!)

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than

the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

Geachte CCD,

Hieronder is de door u verzonden mail met vragen/opmerkingen getoond. Onder deze mail zijn de antwoorden/aangepaste passages naar aanleiding van deze vragen/opmerkingen beschreven:

Geachte mevrouw,

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend en bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen. Het betreft uw project: 'De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie' met aanvraagnummer AVD1050020173184.

Kunt u meer inzicht geven welk aantal dieren welk ongerief zullen ondervinden? Wij komen uit op 15% licht en 85% matig. Is dit correct?

Onder punt L. in de bijlagen beschrijft u alleen de dieren die langer in proef zitten, niet de dieren die na 6 of 48 uur gedood worden.

In de NTS staat dat de dieren om de dag worden gecontroleerd. Het is verplicht dit dagelijks te doen.

Kunt u de beschrijving van de 3V's in de NTS meer aansluiten op de 3V's in het projectvoorstel? U doet bijvoorbeeld werk in celkweken, dat staat niet in de NTS genoemd.

Hieronder zijn de antwoorden/aangepaste passages (in rood weergegeven) naar aanleiding van de hierboven genoemde vragen beschreven:

Vraag 1:
Kunt u meer inzicht geven welk aantal dieren welk ongerief zullen ondervinden? Wij komen uit op 15% licht en 85% matig. Is dit correct?
Antwoord op vraag 1:

De percentages zijn correct.

De mate van ongerief door de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie, glomerulosclerose is licht.

De mate van ongerief door de eenmalige [redacted] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [redacted] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.

Vier maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

De dieren in subonderdeel 1 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 20 dieren.

De dieren in subonderdeel 2 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 24 dieren.

De dieren in de pilot zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 50 dieren.

De dieren in subonderdeel 3 zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 200 dieren.

In totaal ervaren 44 dieren licht ongerief (15% van de dieren) en 250 dieren matig ongerief (85% van de dieren).

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie en GS het gevolg is van de genetische achtergrond van de muizen. De muizen zullen naar

verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [redacted] en het wondje in de staart door bloedafname.

Vraag 2:
Onder punt L. in de bijlagen beschrijft u alleen de dieren die langer in proef zitten, niet de dieren die na 6 of 48 uur gedood worden.
Antwoord op vraag 2:

In subonderdeel 1 zullen de muizen worden gedood 6 uur na de injectie met de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren zullen de aflevering en bio-distributie van de [redacted] in de verschillende experimentele groepen worden bepaald.

In subonderdeel 2 zullen de muizen worden gedood 48 uur na de injectie met de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren wordt de verlaging van EZH2 in de endotheelcellen na behandeling met de verschillende soorten [redacted] bepaald.

In subonderdeel 3 zullen de groepen muizen worden gedood 28 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. Hierin zullen serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

Vraag 3:

In de NTS staat dat de dieren om de dag worden gecontroleerd. Het is verplicht dit dagelijks te doen.
Antwoord op vraag 3:

In dit project worden de volgende humane eindpunten gehanteerd en gewaarborgd:

- Gewichtsverlies van meer dan 20%. De dieren worden om de dag gewogen.
- Extra ongerief door condities niet gerelateerd aan het experiment, zoals wondjes en infecties. Het welzijn wordt dagelijks gecontroleerd.
- Te hoog niveau bloedglucose door diabetes. Dit wordt wekelijks gemeten.
- Te hoge totaal score voor kenmerken van algeheel ongerief, zoals activiteit, wassen, rillen en vachtstructuur. Het gedrag en welzijn wordt dagelijks geobserveerd en bijgehouden.

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

Vraag 4:

Kunt u de beschrijving van de 3V's in de NTS meer aansluiten op de 3V's in het projectvoorstel? U doet bijvoorbeeld werk in celkweken, dat staat niet in de NTS genoemd.
Antwoord op vraag 4:

Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Voordat wordt begonnen aan deze dierstudie is de gestelde hypothese al met succes getest op glomerulaire endotheelcellen in het laboratorium. Er bestaat geen alternatief model voor de ontwikkeling van glomerulosclerose.
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.	1. Een speciale muizenstam (BTBR obese muizen) ontwikkelt spontaan glomerulosclerose zoals bij de mens, in tegenstelling tot chemische modellen. Dit model bootst humane chronische glomerulosclerose het beste na. De muizen ontwikkelen glomerulosclerose in een relatief korte tijdsduur, waardoor interventie kan worden getest in een korte tijdspan. 2. Muizen van een andere muizenstam (anti-Thy 1.1) ontwikkelen door een injectie versneld proteïnurie en glomerulosclerose. Deze stam is geschikt om glomerulosclerose in een korte tijdspan te onderzoeken. Dit model is het meest specifiek in de ontwikkeling van acute proteïnurie en glomerulosclerose. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.
4.2 **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Er wordt verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt door: 1. Statistische berekeningen vooraf 2. Pilot experiment 3. Stapsgewijze uitvoering van experimenten (tevoren vastgestelde go/no go beslismomenten) 4. Er wordt alleen gekozen voor inclusie van muizen die worden gedood op het tijdstip van interventie waarop een mogelijk effect kan worden gemeten.

10.

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.	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	
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: Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project worden twee verschillende groepen muizen gebruikt: (a) BTBR$^{ob/ob}$ muizen en (b) BTBR$^{wt/wt}$ (erkende leverancier):

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (8-20 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

BTBR$^{ob/ob}$ muizen betreffen een model in de BTBR (black and tan, brachyuric) muis. Deze muizen hebben een ob/ob leptine-deficiëntie mutatie en ontwikkelen hierdoor diabetes mellitus type 2 (DMT2), waaronder hyperglycemie en insuline resistentie. Vanaf week 4 ontstaat proteïnurie en vanaf week 8 glomerulosclerose (GS), verlittekening van de filters in de nier (de glomeruli). Na 20 weken zijn glomerulaire laesies aanwezig, die vergelijkbaar zijn met humane GS in diabetische nefropathie. Er is gekozen voor dit model omdat de BTBR$^{ob/ob}$ muizen spontaan glomerulosclerose (GS) ontwikkelen, hetgeen de GS in de humane situatie het best reflecteert. BTBR$^{ob/ob}$ muizen ontwikkelen diabetische nefropathie met chronische GS in een relatief korte tijdsduur, waardoor dit model zeer geschikt is om de hieronder beschreven interventiestudie te toetsen in een (relatief) korte tijdspan. In de literatuur is het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel een gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om diabetische nefropathie en daarmee chronische GS te bestuderen. BTBR$^{wt/wt}$ wordt gebruikt als (niet-diabetische) controle voor BTBR$^{ob/ob}$.

Uit eigen preliminaire data is gebleken dat tijdens diabetische nefropathie in BTBR$^{ob/ob}$ muizen het endotheel is geactiveerd/beschadigd en daardoor het adhesie molecuul E-selectine tot expressie wordt gebracht op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcel. [redacted] specifiek aan de geactiveerde/beschadigde endotheelcellen in de glomerulus worden afgeleverd. Als controle voor

endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted].

Subonderdeel 1
Dit onderdeel heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] biodistributie en de eventuele nier- en levertoxiciteit in diabetische nefropathie te bestuderen.

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt:
De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [redacted]. De BTBR$^{ob/ob}$ controlegroep ontvangt [redacted]), zoals hieronder beschreven:

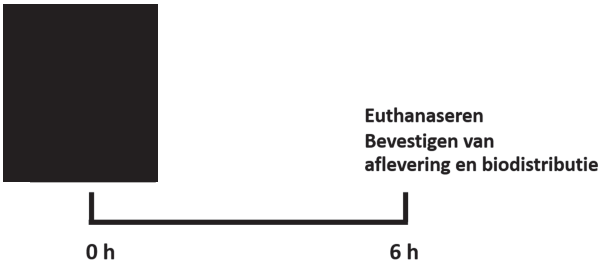
BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted]

Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De groepen muizen worden 6 uur na de [redacted] injectie gedood onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In het geïsoleerde bloed en weefsels wordt de aflevering van de [redacted] de bio-distributie en eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel zijn afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. We hebben reeds vastgesteld in het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel dat E-selectine tot expressie komt op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcellen. De glomerulaire endotheelcellen worden getarget met behulp van [redacted] antilichamen aan te tonen in de weefsels van de BTBR$^{ob/ob}$ muizen. Deze lokalisatie van [redacted] wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel en is eerder met succes uitgevoerd [redacted]

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 2
Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted] worden bestudeerd:

Voor dit doeleinde worden alleen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt:
De muizen worden eenmalig geïnjecteerd met [redacted]), zoals hieronder beschreven:

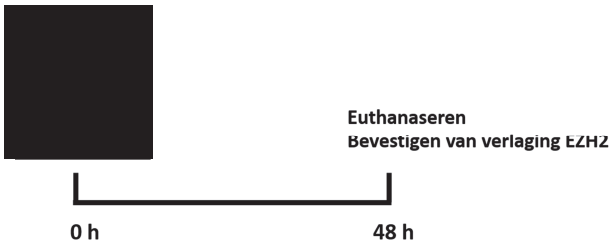
BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden hierbij opgedeeld in 4 verschillende groepen:
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]

- Behandeling met [redacted]

Deze injectie zal plaatsvinden tussen de leeftijd 8 weken en 20 weken oud.

De muizen worden 48 uur na de [redacted] injectie gedood onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd of een verlaging van EZH2 in endotheelcellen plaatsvindt na behandeling met de verschillende soorten [redacted]
Dit tijdspunt wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligen ten opzichte van de controlegroepen die [redacted] hebben ontvangen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [redacted] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulair endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen te behandelen met als doel EZH2 chronisch (gedurende 4 weken) te verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen.
Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met niet-getargere EZH2 remmer uitgevoerd om EZH2 te verlagen. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Voor dit doeleinde worden zowel $BTBR^{ob/ob}$ als $BTBR^{wt/wt}$ muizen gebruikt. In de experimenten worden alle $BTBR^{ob/ob}$ groepen aan elkaar gematched aan de hand van de mate van proteinurie, leeftijd (8-20 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).
Gedurende 4 weken, worden $BTBR^{ob/ob}$ muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [redacted]. $BTBR^{wt/wt}$ zullen gedurende deze 4 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit HEPES en NaCl, pH 6,7. Dit is de buffer waarin de [redacted] zich bevinden. De eerste injectie zal plaatsvinden wanneer de muizen tussen 8 weken en 20 weken oud zijn.
Naast de [redacted] groepen, wordt een groep $BTBR^{ob/ob}$ muizen gedurende 4 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrekkelijke dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep $BTBR^{ob/ob}$ muizen wordt gedurende 4 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De $BTBR^{ob/ob}$ muizen worden onderverdeeld in 7 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met farmacologische small molecule inhibitor van EZH2
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De BTBR$^{wt/wt}$ muizen worden behandeld met vehicle.

De BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden geïnjecteerd met [redacted] welke zich in 100 µl vloeistof bevinden. Het injecteren van vloeistof kan leiden tot hypervolume en derhalve nierschade veroorzaken. Aan het einde van het experiment zullen de nierfunctie waarden van de behandelde BTBR$^{ob/ob}$ muizen worden vergeleken met de nierfunctiewaarden van BTBR$^{wt/wt}$ controle muizen. Mogelijke volume-afhankelijke veranderingen in nierfunctie kunnen worden gecontroleerd door de BTBR$^{wt/wt}$ muizen als vehicle-controle mee te nemen in het experiment.

De benodigde dosis van [redacted] en siRNA is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze vakgroep [redacted]). Tevens zal na uitvoering van subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na uitvoering van subonderdeel 2 zal bekend zijn of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd. Als dit het geval is, betekent dit dat de gebruikte dosis in de subonderdelen 1 en 2 ook in dit subonderdeel 3 zal worden gehanteerd. Indien de gehanteerde dosis niet afdoende is, zal een 10-voudige dosis worden getoetst als beschreven in subonderdeel 2.
De betrekkelijke dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 4 weken zien er als volgt uit:
Op dag -7 (Zeven dagen vóór de eerste injectie met SOS), zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie te kunnen vaststellen voor aanvang van het experiment. Aan de hand hiervan kan schade aan de glomeruli worden gemeten, wat zal worden vergeleken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment. Ook worden aan de hand van deze proteïnurie waarden op dag -7, de BTBR$^{ob/ob}$ muizen ingedeeld, waardoor de proteïnurie in iedere BTBR$^{ob/ob}$ groep gemiddeld gelijk is.
Op dag 0, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie met [redacted] of vehicle worden gegeven. De BTBR$^{ob/ob}$ muizen zijn zwaarder, waardoor bij deze muizen ongeveer 150µl zal worden afgenomen. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen wekelijks worden gemonitord in het bloed. De gezondheidsstatus van de dieren zal dagelijks worden gemonitord.
Iedere week, gedurende 4 weken (28 dagen), zal aan de muizen een injectie met [redacted] of vehicle worden toegediend (**op dag 0, dag 7, dag 14 en dag 21**) en zal bloed worden afgenomen door middel van het wondje in de staart door het knipje in de staart op dag 0.
Op dag 6 en 13 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen om op deze manier de ontwikkeling en progressie van GS gedurende de interventie te kunnen monitoren.
Op dag 27 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de primaire uitkomst parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee kan worden bepaald of de [redacted] groep minder glomerulaire schade heeft na het targeten van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen gedurende 4 weken, ten opzicht van de andere experimentele groepen.
De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde BTBR$^{ob/ob}$ muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [redacted] Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 28 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE						
		Physical examina-tion	Body weight	Injection vehicle/ [redacted] or inhibi-tor/ve-hicle	Blood collec-tion	Urine collectio n (metabo -lic cage 24h)	Harves t kidney + other organs	Weigh organs and fixation/freezing
TIME (days)	-7	X	X			X		
	-6	X	X					
	-5	X						
	-4	X	X					
	-3	X						
	-2	X	X					
	-1	X						
	0	X	X	X	X			
	1	X						
	2	X	X					
	3	X						
	4	X	X					
	5	X						
	6	X	X			X		
	7	X	X	X	X			
	8	X	X					
	9	X						
	10	X	X					
	11	X						
	12	X	X					
	13	X				X		
	14	X	X	X	X			
	15	X	X					
	16	X						
	17	X	X					
	18	X						
	19	X	X					
	20	X						
	21	X	X	X	X			
	22	X	X					
	23	X						
	24	X	X					
	25	X						
	26	X	X					
	27	X				X		

	28	**X**	**X**		**X**		**X**	**X**

Om de rol van EZH2 in het glomerulair endotheel tijdens GS te onderzoeken, wordt 4 weken als tijdspunt aangehouden, aangezien over een langere periode (4 weken) zal worden onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geïnhibeerd en/of gestopt. Op een vroeger tijdspunt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 4 weken worden alle muizen gedood, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren zal worden onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. In de lever, milt en longen wordt onderzocht of hierin veel [redacted] terecht zijn gekomen, aangezien in deze organen veelal liposomen, zoals [redacted] kunnen ophopen. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [redacted] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2 en eventueel een effect hebben gehad op de gevolgen van diabetes mellitus type 2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:
1. Albumine-creatinine ratio (primaire uitleesparameter van nierfuntie)
2. Plasma glucose en insuline (als maat voor DMT2 in de muizen)
3. Urine glucose
4. Urine elektrolyten (als maat voor nierschade)
5. Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
6. Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
7. Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

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.

1. Spontane inductie van GS door genetische achtergrond in BTBR$^{ob/ob}$. Dit is in de literatuur een van de meest gangbare en gestandaardiseerde modellen voor diabetische nefropathie en daardoor chronische GS.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle of [redacted] gedurende 4 weken. De benodigde dosis van [redacted] en siRNA is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze onderzoeksgroep [redacted] Tevens zal na subonderdeel 1 bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en –schade en de status van diabetes mellitus type 2 worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Gedurende 35 dagen zullen de muizen vier keer worden gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Voorafgaand aan huisvesting in metabole kooien wordt door middel van gedragsobservaties en lichaamsgewichtsbepaling vastgesteld dat de dieren in staat zijn een metabole kooi experiment te ondergaan.

5. Doden 28 dagen na eerste intraveneuze injectie, onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 28 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht.

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

Subonderdeel 1:
In dit experiment wordt de aflevering van de [redacted] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [redacted] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd om het aantal benodigde dieren te berekenen.
Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook [redacted] bevatten werden gebruikt, werd een verschil van 70% in aflevering geobserveerd tussen [redacted]. We stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen [redacted]. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 7%
- Effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op maximaal 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen BTBR$^{ob/ob}$ ([redacted])) zullen worden gebruikt. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:
2 groepen x (n=10) = 20 BTBR$^{ob/ob}$ muizen

Subonderdeel 2:
Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse.
In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen vakgroep, waarbij ook [redacted] bevatten werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd. We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van [redacted]. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle BTBR$^{ob/ob}$ groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom n=6 muizen benodigd.
In totaal worden 4 groepen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt ([redacted]
4 groepen x (n=6) = 24 BTBR$^{ob/ob}$ muizen.

Subonderdeel 3:
Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.
Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in BTBR$^{ob/ob}$ muizen wordt de mate van albumine-creatinine ratio (ACR) aangehouden. Uit eerder onderzoek is gebleken dat BTBR$^{ob/ob}$ een albumine-creatinine ratio hebben van gemiddeld 850 µg/mg en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in ACR. De ACR wordt daardoor 680 µg/mg. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: BTBR$^{ob/ob}$ vehicle en BTBR$^{ob/ob}$ [redacted].
Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0,95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in ACR: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen BTBR$^{ob/ob}$ muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 BTBR$^{ob/ob}$ muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgegaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse.
Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de Albumine-Creatinine ratio die wordt gemeten in de urine.
We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Effect grootte in ACR = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle $BTBR^{ob/ob}$ groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.

In totaal worden 1 groep $BTBR^{wt/wt}$ en 7 groepen $BTBR^{ob/ob}$ gebruikt = 8 groepen.
8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 $BTBR^{wt/wt}$ muizen en 175 $BTBR^{ob/ob}$ muizen).

In totaal worden in dit deelproject maximaal gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 $BTBR^{ob/ob}$
- Subonderdeel 2: 24 $BTBR^{ob/ob}$
- Pilot: 50 $BTBR^{ob/ob}$
- Subonderdeel 3: 175 $BTBR^{ob/ob}$ en 25 $BTBR^{wt/wt}$

B. De dieren

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

In deze studie worden type $BTBR^{ob/ob}$ muizen gebruikt, welke door een leptine-deficiëntie mutatie diabetes mellitus type 2 (DMT2) ontwikkelen en daardoor diabetische nefropathie met chronische GS. Deze stam ontwikkelt spontaan GS, waardoor GS niet geïnduceerd hoeft te worden middels aanvullende interventie.
De achtergrond van deze muis is BTBR (black and tan, brachyuric). $BTBR^{wt/wt}$ muizen zijn dezelfde muisstam als $BTBR^{ob/ob}$, maar hebben geen leptine-deficiëntie mutatie in het genoom en daarom vanzelfsprekend geen DMT2, proteïnurie en GS, waardoor deze muis als (niet-diabetische) controle wordt gehanteerd.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, doordat de proteïnurie in de vrouwelijk $BTBR^{ob/ob}$ muizen niet stijgt, maar fluctueert tussen week 8 en week 16 (Hudkins et al, J American Soc Nephrol, 2010). Mannelijke muizen laten tot en met week 20 een stijging in proteïnurie zien. Doordat als primaire uitleesparameter proteïnurie (ACR) wordt gehanteerd, zou het gebruik van vrouwelijke muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere *n* aan muizen benodigd zou zijn. Daarom dat zullen in zowel subonderdeel 1, 2 als 3 mannelijke muizen worden gebruikt.

De leeftijd van de muizen voor het toedienen van de [redacted] is afhankelijk van de expressie van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen. Het is reeds bekend dat op een leeftijd van 24 weken, EZH2 significant is verhoogd in de glomerulaire endotheelcellen in $BTBR^{ob/ob}$ ten opzicht van $BTBR^{wt/wt}$. De [redacted] zullen worden toegediend op het moment dat een verhoging van EZH2 voor het eerst optreedt in $BTBR^{ob/ob}$ ten opzichte van controle dieren $BTBR^{wt/wt}$ of op de vroegst mogelijke leeftijd dat experimenten met de dieren mogelijk

is. Dit moet echter nog worden uitgezocht in weefsels van BTBR$^{ob/ob}$ dieren van verschillende leeftijden. Dit zal worden gedaan in archiefmateriaal in samenwerking met een onderzoeksgroep van de [redacted] Daarom zullen de [redacted] worden toegediend tussen de leeftijden 8 en 24 weken.

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
Voordat wordt begonnen aan deze dierstudie is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor E-selectine tot expressie werd gebracht op het celmembraan, waarna ze zijn blootgesteld aan [redacted]. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress.

Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld.
Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg. Verder is het gebruik van 'lagere' diersoorten niet mogelijk, aangezien de effecten van [redacted] met siRNA primair in het glomerulair endotheel worden onderzocht, waarbij de primaire uitleesparameter ACR is.

Verfijning
Het BTBR$^{ob/ob}$ muismodel is het muismodel voor diabetische nefropathie dat spontaan glomerulosclerose ontwikkelt. Hierdoor hoeven de dieren niet worden geïnjecteerd met chemische middelen en ervaren hierdoor minder ongerief. Tevens ontwikkelen de muizen diabetische nefropathie in een relatief korte tijdsduur. Hierdoor kan de [redacted] interventie worden getest in een korte tijdspan, wat ook minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur.
Er wordt gekozen voor een dosis waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwacht dat geen toxiciteit en ongerief wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden gedood.
Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.

Na bloedafname en injectie met [redacted] onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking.
De muizen worden dagelijks gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling

en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

Vermindering
Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke gedood worden op het tijdspunt van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (4 weken ofwel 28 dagen).

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.

Nadat GS spontaan is ontwikkeld, kan de muis een ziektebeeld vertonen (algeheel ziektebeeld: Vermeerderde eetlust/drinken, gewichtstoename. Om aan de vergrote eetlust te voldoen, zullen de dieren eten en drinken ad libitum krijgen.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.
De gebruikte [redacted] dosis is afgeleid van subonderdelen 1 en 2 en studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde en gepubliceerde studies.
De muizen worden dagelijks gemonitord op deze algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Indien nodig worden dieren eerder opgeofferd dan gepland op basis van bereikte humane eindpunten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

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?

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De niveaus van glucose worden wekelijks gemeten, om de status van de diabetes nauwkeurig in de gaten te houden.

De eetlust van de BTBR$^{ob/ob}$ dieren is verhoogd waardoor deze dieren meer gaan eten, gewichtstoename ondervinden en obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van. Voedsel zal ad libitum worden aangeboden, om te zorgen dat de muizen voldoende te eten hebben. De muizen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze vakgroep, verwachten we geen nier- en levertoxiciteit van de dosis [redacted] Deze dosis is gevalideerd als veilig [redacted]). Deze dosis zal dan ook in dit deelproject worden gebruikt. Het is daarom onwaarschijnlijk dat de muizen toxiciteit van de [redacted] zullen ondervinden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de genetische achtergrond ontwikkelen de muizen diabetes mellitus type 2 en daardoor hyperglycemie en insuline resistentie met als gevolg proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden.

De eetlust van de BTBR$^{ob/ob}$ dieren is verhoogd waardoor obees zullen worden. De muizen ondervinden hier over het algemeen weinig ongerief van.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en vier maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen.

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

Ter verlichting van het lichte ongerief door de vermeerderde eetlust, zal voer ad libitum worden aangeboden in de kooi.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.
De dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en gedood.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, SOS injecties onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen wanneer een van de volgende omstandigheden zich aandienen:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.

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

De muizen worden maximaal 35 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR$^{ob/ob}$ muizen verwacht.

In subonderdeel 2:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in BTBR$^{ob/ob}$ muizen verwacht.

In subonderdeel 3:
Er wordt in de groep BTBR$^{wt/wt}$ muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep BTBR$^{ob/ob}$ muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

K. Classificatie van ongerief

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

De mate van ongerief door de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie, glomerulosclerose is licht.
De mate van ongerief door de eenmalige [redacted] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [redacted] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.
Vier maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 35 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

De dieren in subonderdeel 1 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 20 dieren.
De dieren in subonderdeel 2 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 24 dieren.
De dieren in de pilot zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 50 dieren.
De dieren in subonderdeel 3 zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 200 dieren.
In totaal ervaren 44 dieren licht ongerief (15% van de dieren) en 250 dieren matig ongerief (85% van de dieren).

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2, proteïnurie en GS het gevolg is van de genetische achtergrond van de muizen. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [redacted] en het wondje in de staart door bloedafname.

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.

In subonderdeel 1 zullen de muizen worden gedood 6 uur na de injectie met de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren zullen de aflevering en bio-distributie van de [redacted] in de verschillende experimentele groepen worden bepaald.

In subonderdeel 2 zullen de muizen worden gedood 48 uur na de injectie met de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren wordt de verlaging van EZH2 in de endotheelcellen na behandeling met de verschillende soorten [redacted] bepaald.

In subonderdeel 3 zullen de groepen muizen worden gedood 28 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. Hierin zullen belangrijke serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

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

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.	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in. *Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*	Volgnummer: 2 Type dierproef: Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project worden Thy1.1 muizen gebruikt (erkende leverancier), opgedeeld in 2 groepen: (a) met anti-Thy1.1 antilichamen behandeld voor inductie acute proteïnurie gevolgd door GS (anti-Thy1.1 muizen) (b) met niet-reactief IgG antilichamen behandeld (IgG muizen), als controle groep:

In de experimenten worden alle groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud), gewicht en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd).

De anti-Thy1.1 muis staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarin zich acute proteïnurie ontwikkelt gevolgd door glomerulosclerose (GS). In de glomerulus, op de podocyten, van deze muis komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 60-80% van de glomeruli sclerose bevatten. Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan ontwikkelt en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Doordat een ontstekingsreactie gaande is in de glomeruli van Thy1.1 muizen die anti-Thy1.1 antilichamen

geïnjecteerd hebben gekregen, is het glomerulair endotheel geactiveerd/beschadigd en daardoor wordt het adhesie molecuul E-selectine tot expressie gebracht op het celmembraan van de glomerulaire endotheelcel. E-selectine kan hierdoor als target worden gebruikt om de [redacted]) naartoe af te leveren. [redacted] specifiek aan de geactiveerde/beschadigde endotheelcellen in de glomeruli worden afgeleverd. Als controle voor endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted]

Subonderdeel 1
Dit onderdeel heeft als doel de glomerulaire endotheelcel-specifieke aflevering van [redacted] biodistributie en de eventuele nier-en levertoxiciteit in acute proteïnurie en GS te bestuderen:

In bijlage 1 wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose onderzocht in het chronische BTBR$^{ob/ob}$ model. Deze muizen ontwikkelen glomerulosclerose door een genetische verandering. In de huidige bijlage wordt de rol van EZH2 in de ontwikkeling van glomerulosclerose in het acute anti-Thy1.1 model onderzocht. Deze muizen worden geïnjecteerd met anti-Thy1.1 antistoffen waardoor glomerulosclerose ontstaat.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose in deze modellen door andere stimuli veroorzaakt wordt, kan de activatie van glomerulaire endotheelcellen verschillend kan zijn in beide modellen. Dit kan een andere expressie van E-selectine op het glomerulaire endotheel ten gevolge hebben, waardoor de targeting anders kan zijn. De E-selectine expressie wordt geanalyseerd in archiefmateriaal van anti-Thy1.1 muizen, alvorens het dierexperiment wordt gestart.
Naast een veranderde E-selectine expressie, kan de efficiëntie van targeting verschillend zijn in beide modellen door verstoorde bloedflow of een meer systemische activatie van het endotheel door de anti-Thy1.1 antistoffen.
Om een veranderde targeting vast te kunnen stellen is dezelfde workflow nodig in zowel bijlage 1 als bijlage 2.

Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:
Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren. De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [redacted]), zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden onderverdeeld in 2 groepen:
- Behandeling met E-selectine getargete SOS met daarin siRNA tegen EZH2 (E-sel-SOS-siEZH2)
- Behandeling met IgG-SOS-siEZH2 (niet getarget, wel siEZH2)

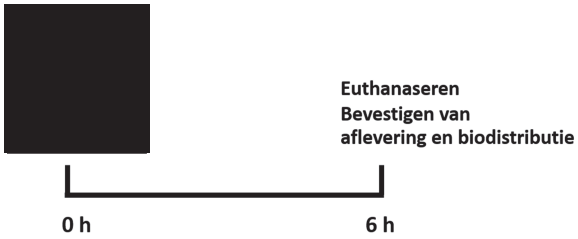
Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden gedood onder volledige anesthesie 6 uur na de [redacted] injectie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdspunt wordt gekozen om de aflevering van [redacted] aan het glomerulair endotheel te onderzoeken, ten opzichte van de aflevering van de [redacted] aan het glomerulair endotheel in de controlegroep die [redacted]) heeft ontvangen. Deze experimentele groepen geven ons de mate van aflevering van de verschillende [redacted] die wordt vastgesteld in de glomeruli, maar ook in de lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta, hart en andere delen van de nier.
In de geïsoleerde bloed en weefsels wordt de aflevering van de [redacted] de bio-distributie en de eventuele nier- en lever-toxiciteit bepaald. In de glomeruli in de nieren wordt bepaald of de [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd. Dit wordt gedaan op de volgende manier:

Wanneer glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn, brengen deze cellen het adhesie molecuul 'E-selectine' tot expressie op het celmembraan, in tegenstelling tot gezonde glomerulaire endotheelcellen. In de anti-Thy1.1 muizen zal de expressie van E-selectine op de glomerulaire endotheelcellen nog worden bepaald in archiefmateriaal alvorens het dierexperiment wordt uitgevoerd. In de glomeruli van dit muismodel vindt een ontstekingsreactie plaats, waardoor het zeer waarschijnlijk is dat de glomerulaire endotheelcellen geactiveerd zijn en daardoor E-selectine tot expressie brengen op het celmembraan. [redacted]

aan de glomerulaire endotheelcellen. De binding van het [redacted] antilichaam aan de glomerulaire endotheelcellen kan worden vastgesteld door de E-selectine antilichamen aan te tonen in de weefsels van de anti-Thy1.1 muizen. Deze lokalisatie van anti-E-selectine antilichamen wordt uitgevoerd in combinatie met het lokaliseren van de glomerulaire endotheelcellen. Deze techniek is operationeel, en is eerder met succes uitgevoerd ([redacted]

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 2
Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel wordt afgeleverd (uitkomst subonderdeel 1), zal de glomerulaire endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2 door [redacted] worden bestudeerd:

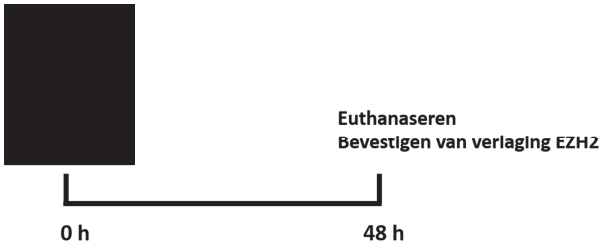
Voor dit doeleinde worden alleen anti-Thy1.1 muizen gebruikt:
Op de leeftijd van 5 weken worden de Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren.
De dag erna worden de muizen eenmalig geïnjecteerd met [redacted], zoals hieronder beschreven:

Anti-Thy1.1 muizen worden hierbij onderverdeeld in 4 verschillende groepen:
- Behandeling met E-selectine getargete [redacted])
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]

Deze injectie vindt plaats 1 dag nadat anti-Thy1.1 antilichamen zijn geïnjecteerd.

De groepen muizen worden gedood 48 uur na de [redacted] injectie onder volledige anesthesie, waarbij bloed, nier, lever, milt, longen, ogen, hersenen, aorta en hart worden uitgenomen. Dit tijdspunt wordt gekozen om zodoende te onderzoeken of [redacted] een verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen bewerkstelligt ten opzichte van de controlegroepen die [redacted]) hebben ontvangen.
In de geïsoleerde weefsels wordt bestudeerd wat de verlaging van EZH2 in endotheelcellen is na de behandeling met de verschillende soorten [redacted] In de glomeruli in de nieren zal worden bepaald of de [redacted] verlaagt in de glomerulaire endotheelcellen.

Hieronder is het experiment schematisch weergegeven:



Subonderdeel 3

Dit onderdeel heeft als doel EZH2 in specifiek het glomerulair endotheel te verlagen met behulp [redacted] om zodoende de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS te onderzoeken. Wanneer [redacted] specifiek aan het glomerulair endotheel worden afgeleverd (subonderdeel 1), en ze EZH2 verlagen in specifiek de glomerulaire endotheelcellen (subonderdeel 2), zal de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS worden onderzocht door muizen gedurende 2 weken te behandelen met als doel EZH2 te verlagen in glomerulaire endotheelcellen.

Voor dit doeleinde worden zowel anti-Thy1.1 muizen als IgG muizen gebruikt. In de experimenten worden alle anti-Thy1.1 groepen aan elkaar gematched aan de hand van leeftijd (5 weken oud) en geslacht (man) (zie B voor motivatie geslacht en leeftijd). Op de leeftijd van 5 weken worden de anti-Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antilichamen om acute proteïnurie en GS te induceren, of de muizen worden onderworpen aan een injectie met niet-reactieve IgG antistoffen als controle groep. Vanaf de dag er na worden de muizen gedurende 2 weken behandeld met [redacted] of vehicle. Naast de endotheelcel-specifieke verlaging van EZH2, wordt tevens een benadering met een niet-getargete EZH2 remmer om EZH2 te verlagen uitgevoerd nadat acute proteïnurie en GS zijn geïnduceerd. Deze groep dient als positieve controle voor het verlagen van EZH2.

Gedurende 2 weken, worden anti-Thy1.1 muizen iedere week geïnjecteerd met vehicle, [redacted], [redacted] IgG muizen zullen gedurende deze 2 weken wekelijks worden geïnjecteerd met vehicle. Vehicle bestaat uit HEPES en NaCl, pH 6,7. Dit is de buffer waarin de [redacted] zich bevinden. De eerste injectie van [redacted] of vehicle zal 1 dag na de injectie met anti-Thy1.1 of IgG antilichamen worden toegediend. Naast de [redacted] groepen, wordt een groep anti-Thy1.1 muizen gedurende 2 weken behandeld met een farmacologische small molecule inhibitor van EZH2. Afhankelijk van de oplosbaarheid en de betrekkelijke dosis zal worden gekozen voor een minipomp of dagelijkse injecties. Een andere groep anti-Thy1.1 muizen wordt gedurende 2 weken behandeld met vehicle.

Hieronder zijn de groepen beschreven:

De anti-Thy1.1 muizen worden opgedeeld in 5 verschillende groepen:

- Behandeling met vehicle
- Behandeling met [redacted])
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met [redacted]
- Behandeling met farmacologische small molecule inhibitor van EZH2
- Behandeling met vehicle van farmacologische small molecule inhibitor van EZH2

De IgG muizen worden behandeld met vehicle.

De benodigde dosis van [redacted] is bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze onderzoeksgroep [redacted]). Tevens is na deelproject 1 en subonderdeel van huidig deelproject bekend of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 bewerkstelligt, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in dit deelexperiment zal worden gehanteerd.
De betrekkelijke dosis van de farmacologische small molecule inhibitor zal nader worden bepaald.

De 2 weken zien er als volgt uit:
Op dag -1 worden de muizen onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 of niet-reactieve IgG antilichamen. De muizen zullen hierna gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie te kunnen vaststellen aan het begin van het experiment. Aan de hand hiervan kunnen we schade aan de glomerulus meten en vergelijken met de proteïnurie waarde aan het einde van het experiment.
Op dag 0, zullen de muizen onder volledige anesthesie worden gebracht waarbij 100µl/25 gram lichaamsgewicht bloed wordt afgenomen door middel van een knipje in de staart en zal de eerste injectie

met [redacted] of vehicle worden gegeven. Gedurende het gehele experiment zal het ziektebeloop van de muizen worden gemonitord in het bloed. De dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn.
Iedere week, gedurende 2 weken (14 dagen), zal aan de muizen een injectie met [redacted] of vehicle worden toegediend (**op dag 0 en dag 7**) en zal bloed (100µl/25 gram lichaamsgewicht/7 dagen) worden afgenomen door middel van het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0.
Op dag 6 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als maat voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen gedurende de interventie.
Op dag 13 zullen de muizen gedurende 24 uur worden gehuisvest in een metabole kooi om in 24-uurs urine de parameter proteïnurie, als meter voor glomerulaire schade te kunnen vaststellen aan het einde van het experiment. Hiermee wordt bepaald of de [redacted] groep minder glomerulaire schade heeft na 2 weken van EZH2 targeting in de glomerulaire endotheelcellen, ten opzicht van de andere experimentele groepen.
De met farmacologische small molecule inhibitor of bijbehorende vehicle behandelde anti-Thy1.1 muizen zullen dezelfde handelingen ondergaan, behalve de injecties met [redacted] Deze muizen zullen in plaats daarvan gedurende 14 dagen behandeld worden via een minipomp of dagelijks intraperitoneaal worden geïnjecteerd met de small molecule inhibitor of vehicle.

Hieronder is het dierexperiment schematisch weergegeven:

		PROCEDURE							
		Physical examina-tion	**Body weight**	**Injec-tion anti-Thy1.1 / IgG**	**Injec-tion vehicle/ [redacted] or inhibi-tor/ve-hicle**	**Blood collec-tion**	**Urine collect-ion (meta-bolic cage 24h)**	**Harvest kidney + other organs**	**Weigh organs and fixation/ freezing**
TIME (days)	**-1**	**X**	**X**	**X**			**X**		
	0	**X**	**X**		**X**	**X**			
	1	**X**	**X**						
	2	**X**							
	3	**X**	**X**						
	4	**X**							
	5	**X**	**X**						
	6	**X**					**X**		
	7	**X**	**X**		**X**	**X**			
	8	**X**	**X**						
	9	**X**							
	10	**X**	**X**						
	11	**X**							
	12	**X**	**X**						
	13	**X**					**X**		
	14	**X**	**X**			**X**		**X**	**X**

Om de rol van EZH2 in glomerulair endotheel te onderzoeken, wordt 2 weken als tijdspunt aangehouden, aangezien over een langere periode (2 weken) wordt onderzocht of de ontwikkeling en progressie van GS kan worden geremd en/of gestopt. Op een vroeger tijdspunt wordt nog niet verwacht effecten te kunnen zien op proteïnurie en GS.

Na 2 weken worden alle muizen gedood, waarbij bloed, nieren, lever, milt, longen, hart, aorta, hersenen en ogen zullen worden uitgenomen. In de nieren wordt onderzocht of glomerulosclerose is verminderd en of tubulaire schade is verminderd. In de lever, milt en longen wordt onderzocht of hierin veel [redacted] terecht zijn gekomen, aangezien in deze organen veelal [redacted], kunnen ophopen. In de rest van de organen zal worden vastgesteld of de [redacted] en de small molecule inhibitor een effect hebben gehad op EZH2.

Primaire uitleesparameters aan het einde van het experiment zijn:

- Albumine-creatinine ratio (uitleesparameter van nierfuntie)
- Urinair elektrolyten (als maat voor nierschade)
- Blood Urea Nitrogen (als marker voor nierschade)
- Plasma NGAL en KIM-1 (als maat voor tubulaire schade)
- Plasma ureum en creatinine waarden als maat voor nierschade, plasma ASAT en ALAT waarden als maat voor leverschade.

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.

1. Inductie van acute proteïnurie gevolgd door GS door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antilichamen.

2. Wekelijkse intraveneuze injectie met vehicle, [redacted] gedurende 2 weken. De benodigde dosis [redacted] wordt bepaald aan de hand van eerder uitgevoerd en gepubliceerde studies in onze onderzoeksgroep [redacted]). Tevens zal na deelproject 1 en subonderdeel 1 van huidig deelproject bekend zijn of de dosis eventuele toxiciteit veroorzaakt en na subonderdeel 2 van huidig deelproject is bekend of de gebruikte dosis een verlaging van EZH2 heeft bewerkstelligd, wat zou betekenen dat de gebruikte dosis ook in subonderdeel 3 zal worden gehanteerd.

3. Wekelijks zal bloed worden afgenomen. Dit zal worden gedaan via het wondje in de staart, dat is veroorzaakt door het knipje in de staart op dag 0. In het bloed zal de nierfunctie en –schade worden gemonitord. Ook eventuele leverschade zal op deze manier worden vastgesteld.

4. Muizen worden 3 keer gehuisvest in een metabole kooi gedurende 24 uur. Echter, de dieren worden alleen 3 keer in de metabole kooi gehuisvest wanneer de dieren vitaal genoeg zijn.

5. Doden 14 dagen na eerste intraveneuze injectie met [redacted] onder volledige anesthesie. Er is gekozen voor interventie gedurende 14 dagen, aangezien de effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen op GS zullen worden onderzocht in dit acuut model.

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

Subonderdeel 1:
In dit experiment wordt de aflevering van de [redacted] in de glomerulaire endotheelcellen en andere organen en delen van de nier, de bio-distributie en eventuele nier- en levertoxiciteit in de muizen onderzocht. Om zekerheid te bieden dat de [redacted] daadwerkelijk worden afgeleverd aan het glomerulair endotheel, is hieronder een poweranalyse uitgevoerd, om het aantal benodigde dieren te berekenen.
Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij ook [redacted] bevatten werden gebruikt, werd een verschil van 70% in aflevering geobserveerd tussen [redacted] We stellen daarom een 70% meer aflevering te willen zien tussen [redacted]. Tevens is uit eerder onderzoek gebleken dat de SD 7% is. Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 7%
- Gewenste effect grootte in aflevering = 70%

Het aantal muizen wordt geschat op 8 muizen per groep, waarbij 2 groepen anti-Thy1.1 muizen ([redacted]. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 2 muizen per groep:
2 groepen x (n=10) = 20 anti-Thy1.1 muizen

Subonderdeel 2:
Het aantal muizen dat per groep minimaal benodigd is om daarmee een significant verschil tussen de experimentele groepen te kunnen verkrijgen, is hieronder berekend door middel van een poweranalyse.
In dit experiment wordt de verlaging van EZH2 in primair de glomerulaire endotheelcellen onderzocht. Aan de hand van gepubliceerde studies, verricht binnen onze eigen onderzoeksgroep, waarbij [redacted] werden gebruikt, werd een verlaging van 50% van het target eiwit bewerkstelligd.
We stellen daarom 50% reductie te willen zien in de expressie van EZH2 als gevolg van de toediening van [redacted]. Uit eerder onderzoek is tevens gebleken dat de SD 25% is.
Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en eenzijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 25%
- Effect grootte in reductie van EZH2 = 50%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=5 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 1 muis per groep. Per groep zijn daarom n=6 muizen benodigd.

In totaal worden 4 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt [redacted]
4 groepen x (n=6) = 24 anti-Thy1.1 muizen.

Subonderdeel 3:
Om een goede indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3, zal een pilot worden uitgevoerd nadat subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd.
Als primaire uitkomstmaat voor de therapeutische effecten van een verlaging van EZH2 in anti-Thy1.1 muizen wordt de mate van glomerulosclerose aangehouden. Uit eerder onderzoek in anti-Thy1.1 muizen is gebleken dat deze muizen een mate van glomerulosclerose hebben van 71% en een SD van 20%. We willen minimaal 20% reductie bereiken in mate van glomerulosclerose, welke daardoor 56,8% Wordt. We verwachten dezelfde relatieve SD, namelijk 20%.

Voor de pilot beperken wij ons tot twee groep muizen: anti-Thy1.1 vehicle en anti-Thy1.1 [redacted]
Het aantal dieren dat nodig is voor deze pilot is berekend middels een poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0,95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Beoogde effectgrootte in glomerulosclerose: 20%

Met behulp van deze poweranalyse is berekend dat voor iedere groep maximaal n=21 dieren benodigd zijn. Doordat de uitval geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, wat uit komt op 4 muizen per groep. Per groep zijn daarom n=25 muizen benodigd. In totaal worden 2 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt. **2 groepen x (n=25) = 50 anti-Thy1.1 muizen.**

Aan de hand van deze pilot zal een indicatie worden verkregen over de effect grootte in subonderdeel 3. Met behulp van deze indicatie zal het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3 worden berekend alvorens de uitvoering van subonderdeel 3. Wanneer geen reductie van minimaal 20% wordt waargenomen in de pilot, wordt niet doorgegaan met subonderdeel 3 (NO GO). Op het moment is een schatting gedaan voor het maximaal aantal benodigde dieren voor subonderdeel 3, welke hieronder is beschreven.

Als primaire uitkomstmaat ter bepaling van de effecten en therapeutische effecten van verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, gebruiken we de mate van glomerulosclerose die wordt gemeten in de nier weefsels.

We stellen tenminste 20% reductie te willen zien in deze parameter als gevolg van de verlaging EZH2 in glomerulaire endotheelcellen. Op het moment wordt een schatting gemaakt dat maximaal n=25 muizen benodigd zijn per groep.

Een a priori poweranalyse, non-parametrisch en tweezijdig getest, is uitgevoerd met behulp van de volgende variabelen:

- α = 0.95
- Power = 90%
- SD = 20%
- Gewenste effect grootte = 20%

Met behulp van deze a priori poweranalyse, is berekend dat maximaal n=21 muizen per groep benodigd zijn. Doordat de uitval in alle anti-Thy1.1 groepen geschat wordt op maximaal 15%, wordt er aan iedere groep 15% extra muizen toegevoegd, dit komt neer op 4 muizen per groep. Per groep is daarom n=25 muizen benodigd.
In totaal worden 1 groep IgG muizen en 7 groepen anti-Thy1.1 muizen gebruikt = 8 groepen
8 groepen x (n=25) = 200 muizen (25 IgG muizen en 175 anti-Thy1.1 muizen).

In totaal wordt in dit deelproject gebruikt: **20 + 24 + 50 + 25 + 175 = 294 muizen**

- Subonderdeel 1: 20 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 2: 24 anti-Thy1.1 muizen
- Pilot: 50 anti-Thy1.1 muizen
- Subonderdeel 3: 175 anti-Thy1.1 en 25 IgG muizen

B. De dieren

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

In deze studie worden anti-Thy1.1 muizen gebruikt, welke model staan voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarin zich acute proteïnurie en GS ontwikkelen. In de glomerulus, op de podocyten van deze stam komt hybrid-humaan-muis Thy1.1 tot expressie. De muis wordt op een leeftijd van 5 weken oud onderworpen aan een eenmalige intraveneuze injectie met anti-Thy1.1 antistoffen. Door deze injectie ontstaat een ontstekingsreactie in de glomeruli waardoor 1 dag na de injectie acute proteïnurie aanwezig is, welke wordt gevolgd door een snelle ontwikkeling van GS, waarbij na 3 weken 71% van de glomeruli sclerose bevatten. Als controle muis worden Thy1.1 muizen geïnjecteerd met een niet-reactief IgG, waardoor geen ontstekingsreactie ontstaat en ook geen acute proteïnurie en GS ontstaan.

Er is gekozen voor dit model omdat dit model het meest specifiek is in de ontwikkeling van acute proteïnurie en GS. Tevens is gekozen voor dit model aangezien glomerulosclerose in een korte tijdspan wordt ontwikkeld en kan worden onderzocht. In de literatuur is de Thy1.1 muis een zeer gangbaar en gestandaardiseerd model dat wordt gebruikt om acute proteïnurie en GS te induceren en te bestuderen.

In eerdere studies is gebruik gemaakt van mannelijke muizen, om de hormonale invloeden in vrouwelijke muizen op het ziekteproces te minimaliseren. In dit project zou het gebruik van vrouwelijk muizen of een mix van m/v kunnen zorgen voor meer spreiding in de uitleesparameter proteïnurie, waardoor een hogere *n* aan muizen benodigd zou zijn. Daarom zullen in zowel subonderdeel 1, 2 en 3 mannelijke muizen worden gebruiken.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging
Voordat we beginnen aan deze dierstudies is onze hypothese al getest op humane glomerulaire endotheelcellen *in vitro*. Deze cellen zijn geactiveerd, waardoor E-selectine tot expressie werd gebracht op het celmembraan, waarna ze zijn blootgesteld aan [redacted]. Verlaging van EZH2 had een remmende werking op processen als opbouw van glycocalyx, inflammatie en oxidatieve stress. Omdat GS een zeer complex proces is waarbij meerdere celtypen en componenten betrokken zijn, is het onmogelijk om alle benodigde experimenten uit te voeren in deze *in vitro* systemen. Hierdoor is het noodzakelijk om gebruik te maken van diermodellen ter bestudering van dit ziektebeeld. Het complex van factoren dat leidt tot glomerulosclerose is niet te bestuderen in lagere diersoorten zoals zebravis of fruitvlieg.

Verfijning
Het anti-Thy1.1 muismodel staat model voor Focal Segmental Glomerulosclerosis, waarbij acute proteïnurie en GS optreden. Anti-Thy1.1 muizen ontwikkelen door een eenmalige injectie versnelde proteïnurie en glomerulosclerose. Hierdoor kan de [redacted] interventie worden getest in een korte tijdspan, wat minder ongerief zal opleveren ten opzichte van langere interventieduur in andere modellen.
Er wordt gekozen voor een dosis [redacted] waarbij in eerder gepubliceerde studies geen toxiciteit is vastgesteld, waardoor geen uitval en ongerief door de dosis verwacht wordt. In *in vitro* experimenten met endotheelcellen is in ons lab gevonden dat een verlaagd niveau van EZH2 in endotheelcellen een positief effect heeft op de endotheelcellen. Hierdoor wordt verwachten dat geen toxiciteit wordt veroorzaakt door verlaging van EZH2 in endotheelcellen te induceren.

Tijdens het experiment worden humane eindpunten toegepast. De dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. Wanneer het dier te veel ongerief ervaart, zal het dier worden gedood.
Voordat een dier in de metabole kooi wordt gehuisvest, wordt bekeken of het dier in goede conditie is om te worden gehuisvest in de metabole kooi.
Na bloedafname en injectie met [redacted] onder anesthesie worden de muizen gehuisvest in een verwarmde kamer, om het herstel van de dieren te bevorderen. Tevens krijgen de muizen kooiverrijking.
De muizen worden dagelijks gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van de proefdierfaciliteit. Tevens worden handelingen met de muizen alleen uitgevoerd door bekwaam en bevoegd personeel van de proefdierfaciliteit.

In de toekomst wordt het waarschijnlijk mogelijk een alternatief te gebruiken, wanneer er wordt beschikt over kidney-on-a-chip technologie met humane cellen. Dergelijke systemen zijn echter nog in ontwikkeling en daarom op dit moment nog niet toepasbaar voor dit huidige project en vraagstelling.

Vermindering
Voordat het experiment wordt begonnen, zal allereerst worden berekend hoeveel muizen er nodig zijn per groep om zekerheid te krijgen over de resultaten van het experiment (poweranalyse). Dit aantal dieren zal worden geïncludeerd. Wanneer subonderdelen 1 en 2 zijn uitgevoerd, zal een pilot experiment met een gering aantal dieren worden uitgevoerd om een indicatie te krijgen van de effect grootte in subonderdeel 3. Hierna zal een poweranalyse worden uitgevoerd om nauwkeurig te kunnen bepalen hoeveel dieren maximaal nodig zijn. Aangezien verwacht wordt dat de therapeutische effecten van langdurige verlaging van EZH2 in de glomerulaire endotheelcellen en de rol van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS niet goed kunnen worden onderzocht in een vroegere fase, wordt alleen gekozen voor de inclusie van groepen muizen welke gedood worden op het tijdspunt van interventie waarop verwacht wordt een effect te kunnen meten (2 weken ofwel 14 dagen).

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.

Nadat GS is geïnduceerd door een eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, kan de muis licht ongerief ervaren. Ter verlichting van het ongerief als gevolg van bloedafname en toediening van [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, ontvangen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.
De gebruikte [redacted] is afgeleid uit deelproject 1, studies uit de literatuur en eigen uitgevoerde en gepubliceerde studies.
De muizen worden dagelijks gemonitord op algehele verschijnselen van ongerief door de onderzoekers in

samenwerking met de biotechnici en dierverzorgers van het CDP. De muizen worden niet langer in studie gehouden dan nodig is aan de hand van het eventueel bereiken van het humaan eindpunt.

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.

Aan de hand van het bestuderen van de literatuur in dit vakgebied is gebleken dat deze dierproeven niet eerder zijn uitgevoerd. Er is nog niet eerder cel-specifieke interventie toegepast in onderzoek naar glomerulosclerose in diermodellen.

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?

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS. Hierdoor zullen de muizen licht ongerief ondervinden. De muizen zullen dagelijks worden

gecontroleerd op welzijn.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen. De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole kooi te worden gehuisvest.
Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

Uit resultaten van deelproject 1 en eerder gepubliceerde onderzoeken binnen onze onderzoeksgroep, wordt geen nier- en levertoxiciteit van de [redacted] verwacht.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Als gevolg van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 antistoffen, ontwikkelen de muizen acute proteïnurie en GS en zullen hierdoor licht ongerief ondervinden.

De muizen zullen matig ongerief ervaren door wekelijkse [redacted] of vehicle injecties, wekelijkse bloedafname en drie maal huisvesting in metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen.

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

Ter verlichting van het ongerief door het afnemen van bloed en het toedienen van de [redacted] of vehicle onder algehele anesthesie, krijgen de muizen kooiverrijking en zullen de muizen in een verwarmde kamer worden gehouden.

De muizen zullen alleen in de metabole kooi worden gehuisvest wanneer de muizen vitaal genoeg zijn. Er wordt daarom vooraf aan de huisvesting in de metabole kooi bekeken of het dier in goede conditie is om in de metabole te worden gehuisvest.

De dieren zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Wanneer een dier het humaan eindpunt heeft bereikt, zal het uit de studie worden gehaald en gedood.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Doordat de ontwikkeling van glomerulosclerose licht ongerief veroorzaakt en bloedafname, [redacted] injecties onder algehele anesthesie en huisvesting in de metabole licht tot matig ongerief zullen veroorzaken, wordt verwacht dat er zich weinig omstandigheden voor zullen doen waarbij humane eindpunten zullen worden geïndiceerd. De muizen zullen uit de studie worden genomen bij de volgende omstandigheden:

- Gewichtsverlies van >20% ten opzichte van het begingewicht.
- Extra ongerief als gevolg van condities welke niet zijn gerelateerd aan het experiment (wondjes, infecties, trauma).
- Indien een of meer van de volgende punten optreedt: aanzienlijke vermindering in activiteit, aanzienlijke vermindering in wassen, rillen en aangetaste vachtstructuur. Deze parameters zullen nauwkeurig worden gemonitord aan de hand van individuele welzijnsscoreformulieren.
- Betrouwbare resultaten kunnen niet meer behaald worden door condities die niet direct gerelateerd zijn aan het experiment

Wanneer humane eindpunten zijn bereikt worden de dieren voortijdig uit het experiment genomen.
Daarnaast blijven de muizen maximaal 15 dagen in het experiment.

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

De muizen worden maximaal 15 dagen in de studie gehouden. Uit eerder toegepaste modellen is bekend dat de uitval varieert tussen 10% en 15%.

In subonderdeel 1:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 2:
Er wordt niet meer uitval dan 15% in anti-Thy1.1 muizen verwacht.

In subonderdeel 3:
Er wordt in de groep IgG muizen, behandeld met vehicle 5% uitval verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met [redacted] niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.
Er wordt in de groep anti-Thy1.1 muizen, behandeld met vehicle van small molecule inhibitor niet meer uitval dan 15% verwacht.

K. Classificatie van ongerief

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

De mate van ongerief door de ontwikkeling van proteïnurie en GS is licht.
De mate van ongerief door de eenmalige anti-Thy1.1 en [redacted] injectie is geschat als licht. De wekelijkse [redacted] of vehicle injecties en wekelijkse bloedafname is ingeschat als matig.
Drie maal huisvesting in een metabole kooi gedurende 24 uur in een tijdsperiode van 15 dagen zal licht ongerief veroorzaken.

De dieren in subonderdeel 1 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 20 dieren.
De dieren in subonderdeel 2 zullen licht ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 24 dieren.
De dieren in de pilot zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 50 dieren.
De dieren in subonderdeel 3 zullen matig ongerief ervaren. Dit zijn in totaal 200 dieren.
In totaal ervaren 44 dieren licht ongerief (15% van de dieren) en 250 dieren matig ongerief (85% van de dieren).

Deze mate van ongerief is onvermijdelijk, aangezien de ontwikkeling van proteïnurie en GS het gevolg is van de eenmalige injectie met anti-Thy1.1 injectie. De muizen zullen naar verwachting geen ongerief ondervinden van de gevolgen van de injectie met [redacted] en het wondje in de staart door bloedafname.

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.

In subonderdeel 1 zullen de muizen worden gedood 6 uur na de injectie met de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren zullen de aflevering en bio-distributie van de [redacted] in de verschillende experimentele groepen worden bepaald.

In subonderdeel 2 zullen de muizen worden gedood 48 uur na de injectie met de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren. In het bloed en de organen van deze dieren wordt de verlaging van EZH2 in de endotheelcellen na behandeling met de verschillende soorten [redacted] bepaald.

In subonderdeel 3 zullen de groepen muizen worden gedood 14 dagen na de eerste injectie met vehicle of de verschillende condities [redacted] om bloed en organen te isoleren.
Hierin zullen serologische, histologische en biochemische parameters worden bestudeerd welke essentieel zijn voor het bepalen van het effect van de verlaging van EZH2 in glomerulaire endotheelcellen tijdens GS, en de rol van EZH2 in glomerulair endotheel in de onderliggende cellulaire en moleculaire processen tijdens

GS. Deze parameters worden vergeleken in de verschillende experimentele groepen, om op deze manier de effecten vast te stellen.

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

12.

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
[redacted]
A. Deusinglaan 1 [redacted]
9713 AV GRONINGEN

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1050020173184
Bijlagen
1

Datum 25 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 25 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie" met aanvraagnummer AVD1050020173184. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 september 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u gevraagd het ongerief van de dieren in meer detail te beschrijven. Voor de NTS is gevraagd de 3V's meer inhoudelijk te beschrijven. Op basis hiervan zijn de bijlagen dierproeven aangepast en heeft u een herziene NTS ingediend.

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 "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 26 september 2017 tot en met 1 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure
Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 25 augustus 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.
Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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

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

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

[redacted]

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Datum:
25 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

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:	Rijksuniversiteit Groningen
Adres:	A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats:	9713 AV GRONINGEN
Deelnemersnummer:	10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 september 2017 tot en met 1 juni 2022, voor het project "De rol van Enhancer of Zeste Homolog 2 in glomerulair endotheel in de nier tijdens de ontwikkeling van glomerulosclerose: aangrijpingspunt voor interventie" met aanvraagnummer AVD1050020173184, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Promovendus.
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2017
2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2017;
b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 september 2017;
c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 25 augustus 2017, ontvangen op 25 augustus 2017.
d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 19 september 2017

Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Deelproject 1: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens chronische GS				
	Muizen (Mus musculus) /	294	85% Matig 15% Licht	
3.4.4.2 Deelproject 2: Het bestuderen van het effect van glomerulair endotheel-specifieke verlaging van EZH2 tijdens acute proteïnurie en GS				
	Muizen (Mus musculus) /	294	85% Matig 15% Licht	

Voorwaarden

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

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

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

Centrale Commissie Dierproeven

Aanvraagnummer:
AVD1050020173184

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.