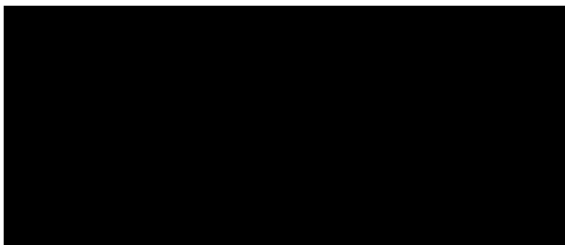




> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

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

**Onze referentie**  
W16-04S

**Uw referentie**  
ccd-2015201, ccd-2015205,  
ccd-2015206, ccd-2015206,  
ccd-2015208, ccd-2015209,  
ccd-2015210, ccd-2015212,  
ccd-2015220, ccd-2015221,  
ccd-2015222, ccd-2015223,  
ccd-2015225, ccd-2015227,  
ccd-2015228, ccd-2015229,  
ccd-2015189

**Briefkenmerk**  
CCD-2017-397

Datum **30 NOV 2017**  
Betreft Wob-besluit W16-04S

Geachte mevrouw ,

In uw e-mails van 3 en 4 maart 2016 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) om informatie verzocht met betrekking tot de volgende projectvergunningen:

- 2015201 Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibroze) (uw kenmerk ccd-2015201);
- 2015205 Nieuwe catheters voor echografie in het hart (uw kenmerk ccd-2015205);
- 2015206 Behandeling van hartritmestoornissen (uw kenmerk ccd-2015206);
- 2015207 Het meten van de voedingswaarde van nieuwe eiwitten (uw kenmerk ccd-2015206<sup>1</sup>);
- 2015208 Effecten van darmbacteriën op ontwikkelingsstoornissen zoals ADHD en autismespectrumstoornis (uw kenmerk ccd-2015208);
- 2015209 Ontwikkeling van tracers om tumoren zichtbaar te maken en kanker gericht te behandelen (uw kenmerk ccd-2015209);
- 2015210 Onderzoek naar de invloed van taalgenen op de hersenontwikkeling en hersenfunctie (uw kenmerk ccd-2015210);
- 2015212 Optimalisatie van therapie voor voedselallergieën met voedingssupplementen (uw kenmerk ccd-2015212);
- 2015220 Het remmen van reuma via de EP4-receptor (uw kenmerk ccd-2015220);
- 2015221 De veiligheid van een nieuwe behandeling van alvleesklierkanker (uw kenmerk ccd-2015221);

<sup>1</sup> Opgemerkt wordt dat het kenmerk niet overeenkomt met het NTS nummer en dat uw kenmerk ccd-2015206 voor zowel documenten bij NTS 2015206 en NTS2015207 gebruikt is.

- 2015222 Betere chemotherapie bij alvleesklierkanker (uw kenmerk ccd-2015222);
- 2015223 Orgaanbescherming in cardiopulmonaire bypass chirurgie (uw kenmerk ccd-2015223);
- 2015225 Therapeutische maatregelen om de uitkomst van vroeggeboren (premature) kinderen te verbeteren (uw kenmerk ccd-2015225);
- 2015227 Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalkig en suikerziekte (uw kenmerk ccd-2015227);
- 2015228 Nieuwe inzichten in en behandeling van cocaïne en methamphetamine verslaving (uw kenmerk ccd-2015228);
- 2015229 Beeldvorming in harde tissue engineering (uw kenmerk ccd-2015229);
- 2015189 Individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid (uw kenmerk ccd-2015189).

U verzocht om alle correspondentie over deze aanvragen. Kort na de ontvangst van uw verzoek is aan u een schriftelijke bevestiging gezonden.

De CCD komt discretionaire bevoegdheid toe bij het afbakenen van haar bestuurlijke aangelegenheden. Volgens artikel 1 aanhef en onder b van de Wob is een bestuurlijke aangelegenheid een aangelegenheid die betrekking heeft op beleid van een bestuursorgaan, daaronder begrepen de voorbereiding en de uitvoering ervan. Het begrip bestuurlijke aangelegenheid dient ruim te worden uitgelegd (dit blijkt onder andere uit de uitspraken van de Raad van State van 28 mei 2014, ECLI:NL:RVS:2014:1870 en 21 augustus 2013, ECLI:NL:RVS:2013:796).

Voor de afbakening van een bestuurlijke aangelegenheid kan worden gekeken naar onder andere de reikwijdte van een toepasselijk algemeen verbindend voorschrift, de vergelijkbaarheid van het handelen van de normadressant en de normsteller, de kring van belanghebbenden of het van toepassing zijnde tijdvak. Aangezien uw brieven (mails) telkens betrekking hebben op documenten die de betrokken vergunninghouders en DEC's op basis van hetzelfde algemeen verbindend voorschrift hebben verstrekt, zijn wij, gelet op de jurisprudentie hierover, van mening dat uw brieven zien op één bestuurlijke aangelegenheid. Om die reden zijn de verzoeken om informatie samengevoegd. Hierbij kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de Raad van State van 24 augustus 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:2312) en de hiervoor reeds genoemde uitspraak van de Raad van State van 28 mei 2014.

#### **Verdaging en opschorting**

Met de brief van 31 maart 2016 is u kenbaar gemaakt dat de beslistermijn met vier weken is verdaagd. Daarnaast is bij brief van 11 april 2016 aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort, vanwege het vragen van zienswijzen aan derde belanghebbenden. Middels de brief van 6 mei 2016 hebben wij u kenbaar gemaakt dat een van de betrokken derde belanghebbenden om een nadere termijn van vier weken voor het indienen van een zienswijze heeft verzocht. Wij hebben een nadere termijn van vier weken – gerekend vanaf 2 mei 2016 – verleend. Hierdoor is de uiterste beslistermijn verschoven naar 30 mei 2016.



### **Wettelijk kader**

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

### **Inventarisatie documenten**

Op basis van uw verzoek zijn verscheidene documenten aangetroffen. De documenten zijn per projectvergunning genummerd en opgenomen in een bijbehorende inventarislijst. De inventarislijsten maken onderdeel uit van de (eventueel) te openbaren documenten. In de inventarislijsten wordt per document aangegeven of het document geheel wordt geopenbaard, gedeeltelijk wordt geopenbaard of volledig wordt geweigerd. Hierbij worden tevens de wettelijke weigeringsgronden aangegeven.

### **Zienswijzen**

Bij de openbaarmaking van de documenten zijn derde belanghebbenden betrokken en zij zijn in de gelegenheid gesteld om over de eventuele openbaarmaking van de documenten een zienswijze te geven. De ingediende zienswijzen zijn meegenomen bij de behandeling van dit besluit.

### **Besluit**

Hierbij besluiten wij een deel van de door u gevraagde informatie te openbaren. Voor het overige wordt de door u gevraagde informatie niet openbaar gemaakt. Voor de motivering verwijzen wij u naar het onderdeel 'Overwegingen' in dit besluit en de bijgevoegde inventarislijsten per vergunning.

### **Reeds openbare documenten**

Van iedere verleende vergunning wordt een niet-technische samenvatting (hierna: NTS) op de website van de CCD ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)) gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar. Per projectvergunning staat in de inventarislijst aangegeven welk document de NTS betreft.

### **Overwegingen**

Op grond van artikel 3 lid 5 van de Wob wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van hetgeen is bepaald in de artikelen 10 en 11 van de Wob.

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

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

### **Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer**

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

Alle vergunninghouders en DEC's doen een beroep op de bescherming van de persoonlijke levenssfeer met het oog op weigering van persoonsnamen en gegevens die direct zijn te herleiden naar personen. Het betreft in ieder geval de persoonsnamen, directe telefoonnummers en directe emailadressen die staan vermeld in de aanvraagformulieren, de ontvangen en verzonden brieven, ontvangen en verzonden e-mails en de vergunningen en beschikkingen.

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

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

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

Wanneer men de publicaties van het DTN van afgelopen tien jaren bekijkt, is te zien dat er een golfbeweging is met betrekking tot de mate van acties van dierenrechtenactivisten, waarbij niet valt uit te sluiten dat het dierenrechtenactivisme weer opkomt. Dit is afhankelijk van allerlei factoren, die zich vooraf niet laten voorspellen. Hierdoor is niet in te schatten welke vergunning een dreiging van dierenrechtenactivisme met zich meebrengt. Het gegeven dat in het recente DTN (nummer 45) een lager actueel dreigingsbeeld van dierenrechtenactivisten is opgenomen, betekent niet dat (de vrees voor) bedreigingen en intimidaties van het dierenrechten extremisme niet meer actueel zijn. Het dreigingsbeeld toont immers de afgelopen tien jaren een afwisselend beeld met een hoger en minder hoog dreigingsbeeld.

Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt ook uit de recente uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de



Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498).

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

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

- namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen,
- directe telefoonnummers en directe e-mailadressen,
- de functies van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen,
- handtekeningen en eventueel faxadressen en rekeningnummers indien deze direct herleidbaar zijn tot personen,
- specifieke informatie uit de aanvraag zoals hieronder toegelicht.

Zoals in het voorgaande toegelicht, is de CCD met betrekking tot deze gegevens van oordeel dat de bescherming van de persoonlijke levenssfeer zwaarder weegt dan het belang van de openbaarmaking.

In aanvulling hierop wordt het volgende opgemerkt:

Vergunninghouder bij NTS2015201 stelt dat het in de aanvraag opgegeven IBAN nummer van de betrokken onderzoeker zelf is en naar deze persoon herleidbaar is. Om die reden wordt deze informatie geweigerd. Deze vergunninghouder stelt tevens dat het noemen van combinaties van gegevens kan leiden tot identificatie van individuele personen uit de onderzoeksgroep betrokken bij het project. De afdelingen zijn betrekkelijk klein en binnen elke afdeling is maar een zeer kleine groep onderzoekers werkzaam. Gesteld wordt dat deze informatie geweigerd dient te worden. De vergunninghouder bij NTS2015227 heeft in de zienswijzen een vergelijkbare motivering gegeven om welke redenen deze informatie geweigerd moet worden. De CCD is van oordeel dat deze informatie uit de aanvraag in combinatie met de openbaar te maken gegevens via een zoekprogramma op internet eenvoudig zijn te herleiden tot individuen uit de onderzoeksgroep en om die reden geweigerd dient te worden.

Vergunninghouder bij NTS2015206 verzocht in de zienswijze de naam van afdeling te weigeren. De naam van de afdeling in combinatie met de functie is via een zoekprogramma op internet en de context van de informatie herleidbaarheid naar een persoon. De functienaam wordt wel openbaar gemaakt.

Vergunninghouder bij NTS2015222 verzocht in de zienswijzen de projectnaam te weigeren. De naam van het project in combinatie met de naam van vergunninghouder is via een zoekprogramma op internet eenvoudig zijn te herleiden tot betrokken onderzoekers uit de onderzoeksgroep en om die reden geweigerd dient te worden. Deze gegevens dienen om die reden geweigerd te worden. Dat geldt eveneens voor de in het projectvoorstel en de andere bijlage dierproeven weggelakte woorden.

Vergunninghouder verbonden aan NTS:2015228 verzoekt de titel van het onderzoek te weigeren vanwege herleidbaarheid naar de onderzoeksgroep. Deze titel staat opgenomen in het Dec advies, het projectvoorstel, het besluit en de bijlagen bij de ontvangstbevestiging. Bovendien staat in de titel essentiële informatie opgenomen die inzicht geeft in de onderzoeksopzet. De NTS (werk)titel is wel openbaar. Ten aanzien hiervan wordt verwezen naar de bij NTS2015201 opgenomen motivering. De CCD kan zich vinden in het weigeren van deze informatie.

De vergunninghouder bij NTS2015225 stelt dat de functie en afdeling van de plaatsvervangend onderzoeker geweigerd dienen te worden. De CCD is van oordeel dat de functie dermate algemeen is dat deze niet herleidbaar is tot een persoon. In de zienswijzen ontbreekt bovendien een nadere motivering. Uit de NTS volgt vervolgens welke afdeling bij het project betrokken is. Er bestaat dan ook onvoldoende aanleiding deze informatie te weigeren. Dit geldt ook voor het algemene emailadres van de Dec. Het emailadres staat op de website van vergunninghouder opgenomen.

In de documenten bij NTS 2015208, NTS2015209, NTS2015221, NTS2015223, NTS2015228 en NTS 2012229 worden tevens een aantal referenties geweigerd, vanwege directe herleidbaarheid naar (leden van) het onderzoeksteam.

Ten aanzien van NTS2015209 wordt specifiek opgemerkt dat enkele termen geweigerd dienen te worden. Deze termen in combinatie met de openbaar gemaakte naam van vergunninghouder zijn direct te herleiden tot onderzoeksactiviteiten of resultaten van het betreffende onderzoeksteam en daarmee tot persoonsnamen. Deze termen worden om deze reden geweigerd. Identieke overwegingen gelden voor weigeringen in deze documenten bij NTS2015229.

De CCD heeft deze zienswijzen betrokken in haar conclusie en is van oordeel dat ten aanzien van deze gegevens het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaarder moet wegen dan het belang van openbaarheid, vanwege de nog altijd reële kans op dierenrechtenextremisme, hetgeen hiervoor reeds is aangegeven. Bovendien volgt uit de Memorie van Toelichting bij de Wod dat de belangen van de bescherming van de gegevens die herleidbaar zijn naar personen in afweging tot openbaar maken van deze gegevens zwaar moet wegen. Betrokkenen moeten vrijelijk en anoniem hun werk kunnen doen.

Wat betreft proefdier- dan wel sublocaties kan deze informatie direct tot personen herleidbaar zijn. Om deze redenen worden de in NTS 2015208, NTS 2015209 en NTS 2015210 opgenomen locaties geweigerd. Hierbij kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463). Voor wat betreft de specifieke dierproeflocaties kan tevens aangesloten worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) en de Memorie van Toelichting bij de Wod (*Kamerstukken II* 2012/13, 33692, nr. 3, p. 14). Uit de uitspraak volgt dat namen en (adres)gegevens van organisatorische werkeenheden waar onderzoek wordt



verricht, op grond van artikel 10 lid 2 aanhef en onder e van de Wob niet hoeven te worden geopenbaard. Bovendien blijkt uit de Memorie van Toelichting: *dat door openbaarmaking van bepaalde gegevens die niet direct de persoonlijke levenssfeer raken, uiteindelijk toch achterhaald kan worden welke personen betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven. Hierbij kan worden gedacht aan openbaarmaking van een locatie waar dierproeven worden verricht.*

In de inventarislijsten is per projectvergunning aangegeven welke documenten gedeeltelijk worden geopenbaard op grond van bovenstaande wettelijke weigeringsgrond.

### **Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling**

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

#### *Herleidbaarheid*

Integrale openbaarmaking van de door u opgevraagde gegevens leidt in bepaalde gevallen tot onevenredige benadeling van de organisaties en de medewerkers waarop en op wie de gegevens betrekking hebben. In de bijgevoegde inventarislijsten is per document aangegeven welke documenten informatie bevatten die rechtsreeks of op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken personen uit de onderzoeksgroep. Het is niet uitgesloten dat openbaarmaking van deze gegevens vanuit dierenrechtenactivisten buitensporige reactie kunnen opleveren jegens deze personen. Om voornoemde redenen zullen de navolgende gegevens – waarmee deze organisaties of personen geïdentificeerd kunnen worden – uit de documenten worden verwijderd:

- Namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen (zie hiervoor tevens het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer');
- Locatiegegevens van proefdierlocaties en sublocaties, zoals straatnaam, postcode, plaats, maar ook de afdeling en het organisatieonderdeel wanneer deze door de betreffende organisatie nog niet zijn geopenbaard, door bijvoorbeeld een vermelding op een website;
- Emailadressen, telefoonnummers, handtekeningen en eventueel faxadressen en rekeningnummers die direct herleidbaar zijn tot personen (zie hiervoor tevens het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer');

Zoals hiervoor reeds aangegeven, wordt openbaarmaking van een gedeelte van bovenstaande gegevens eveneens vanwege het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer geweigerd.

De gelakte termen in documenten bij NTS2015201 dienen te worden geweigerd op grond van vergelijkbare overwegingen als opgenomen bij de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

Ten aanzien van de geweigerde referenties wordt verwezen naar hetgeen is opgemerkt bij het onderdeel eerbiediging persoonlijke levenssfeer. Deze gegevens worden tevens geweigerd op grond van onevenredige benadeling.

Ten aanzien van NTS2015209 wordt specifiek opgemerkt dat enkele termen geweigerd dienen te worden. Deze termen zijn in combinatie met de openbaar gemaakte naam van vergunninghouder direct te herleiden tot onderzoeksactiviteiten of resultaten van het betreffende onderzoeksteam en daarmee tot persoonsnamen. Deze termen worden om deze reden geweigerd.

Voor wat betreft de Dec verbonden aan NTS 2015208 en NTS 2015209 wordt de locatie in het gebouw waar de Dec kantoor houdt, geweigerd.

In NTS 2015210 wordt tevens een directe verwijzing naar een proefdierlocatie geweigerd. Voor de motivering wordt verwezen naar het onderdeel 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer'.

#### Deelnemersnummer/Dec nummer

De opdrachtgever van vergunninghouder verbonden aan NTS 2015212 vreest misbruik van het deelnemersnummer van vergunninghouder en verzoekt om weigering van het deelnemersnummer/Dec nummer en adresgegevens van vergunninghouder en Dec. Aangezien vergunninghouder zelf geen bezwaar heeft tegen het openbaar maken van het nummer en adres en bovendien de naam van vergunninghouder openbaar gemaakt wordt en deze herleidbaar is naar het deelnemersnummer bestaat er geen aanleiding om dit nummer te weigeren. Vergelijkbare motivering gaat op met betrekking tot het verzoek tot weigering van het Dec nummer van de DEC. De opdrachtgever van vergunninghouder heeft geen eigen Dec. De Dec van vergunninghouder is zelfstandig derde belanghebbende en heeft geen bezwaren tegen het openbaar maken van hun Dec nummer en adresgegevens. Zoals in de zienswijze terecht is aangegeven staat deze informatie reeds op de site van vergunninghouder. Met betrekking tot de genoemde nummers stellen wij vast dat niet valt in te zien op welke wijze dit herleidbaar is naar personen of anderszins nadelig effect heeft. In de zienswijze is hierover ook geen onderbouwing opgenomen. Zowel het Dec nummer als het deelnemersnummer wordt openbaar gemaakt. De CCD voelt zich hierbij gesteund door vaste jurisprudentie.

#### *Voorkomen van fraude*

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

#### *Concurrentiegevoelige informatie*

Indien openbaarmaking van concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie leidt tot onevenredige benadeling, kan onder omstandigheden succesvol een beroep op de weigeringsgrond het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling worden gedaan.

Meerdere derde belanghebbenden hebben verzocht om concurrentiegevoelige gegevens te weigeren. Zij hebben het standpunt dat het gegevens betreft die van belang zijn voor publicatie of patentering van onderzoeken, zodat het belang van





voorkoming van onevenredige benadeling van de betrokkenen als bedoeld in artikel 10, tweede lid, aanhef en onder g, van de Wob zich tegen openbaarmaking verzet. Het is van belang dat het onderzoek en de daarbij gebruikte informatie te beschermen, niet alleen voor het onderzoek zelf, maar ook met het oog op een eerste publicatie en de eventuele registratie van patenten. Door het openbaar maken van de gegevens kunnen concurrenten het onderzoek kopiëren en de onderzoeker vóór zijn, zodat het belang van de onderzoeker of wetenschapper onevenredig wordt geschaad.

De CCD is van oordeel dat voldoende is aangetoond dat met name de samenstelling en eigenschappen van bepaalde gebruikte stoffen en vaccins in het huidige onderzoek essentieel zijn en het niet wenselijk acht wanneer deze informatie reeds in dit stadium wordt geopenbaard. De termen en/of passages zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot het productieproces. Slechts enkele termen en/of passages, welke bedrijfs- en fabricagegegevens zijn, worden middels dit besluit geweigerd. Welke NTS-en het betreft is hieronder inzichtelijk gemaakt.

Aangaande NTS2015189 hebben de vergunninghouder en de DEC middels een zienswijze aangegeven dat de voorlopige onderzoeksresultaten sterke aanwijzing geven over de gebruikte strategie en exact inzicht geven op welke wijze de proef plaatsvindt. Wanneer deze informatie openbaar wordt gemaakt, geeft het in dit stadium van het onderzoek te veel inzicht in het betreffende onderzoek. Dit is schadelijk voor de voortgang van het onderzoek, omdat concurrenten deze informatie kunnen gebruiken voor eigen onderzoek. Bepaalde concurrenten beschikken over technieken om hetzelfde onderzoek uit te voeren. Bovendien lopen onderzoekers het risico niet als eerste te kunnen publiceren over de specifieke onderzoeksresultaten. Om die reden zijn in het projectvoorstel als in de eerste bijlagen dierproeven een beperkt aantal alinea's geweigerd.

Vergunninghouder bij NTS2015223 heeft vergelijkbare overwegingen als vergunninghouder betrokken bij NTS2015189. Ook deze informatie wordt geweigerd.

Vergunninghouder verbonden aan NTS2015221 heeft gesteld dat de naam van het in het in de proef voorkomend instrument geweigerd dient te worden. De naam van het instrument geeft inzicht in de strategie hetgeen aanwezige concurrentie onevenredig veel voordeel geeft. Deze informatie wordt om die reden geweigerd.

Vergunninghouder bij NTS2015212 stelt dat de onderzoeksstrategie en de dierproeven zelf gedetailleerd staan beschreven. Elke afzonderlijke stap is inzichtelijk gemaakt. Hieruit valt eenvoudig op te maken voor welke toepassing de (nieuwe) ingrediënten worden getest. Ook wordt genoemd tegen welke allergie wordt getest en worden de te testen ingrediënten genoemd. Om die reden is de onderzoeksstrategie geweigerd daar waar informatie wordt gegeven over specifieke allergieën waartegen getest wordt en de specifieke ingrediënten die getest worden, en waar details over de uit te voeren protocollen staan vermeld. Het openbaar maken van deze informatie is onevenredig benadelend voor het onderzoek vanwege de concurrentiepositie, toekomstige aanvragen voor intellectueel eigendom en toekomstige octrooiaanvragen.

Vergunninghouder verbonden aan NTS2015220 en NTS2015228 stelt op vergelijkbare gronden dat de te testen stof specifieke kenmerken heeft en wat deze stof bewerkstelligt. Indien deze informatie openbaar wordt, is op een eenvoudige manier, zeker in de context van alle overige openbaar gemaakte informatie, te achterhalen waar onderzoek naar wordt gedaan. Het betreft concurrentiegevoelige informatie.

De CCD is van oordeel dat de bovengenoemde derde belanghebbenden voldoende inzichtelijk hebben gemaakt om welke redenen de genoemde informatie geweigerd dient te worden op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling. Van belang is dat de betrokken onderzoekers als eerste de resultaten van het onderzoek kunnen publiceren. Daarnaast worden termen genoemd die sterke aanwijzing geven over de gebruikte strategie en de wijze van immunisatie. Deze informatie is zeer gevoelig voor concurrenten in vergelijkbare branches. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling voor de vergunninghouder en DEC dient derhalve zwaarder te wegen dan het belang van openbaarmaking. Gelijke overwegingen gelden voor enkele termen en in enkele gevallen een beperkt aantal zinnen in de bijlagen dierproeven en het Dec advies bij NTS2015220. Meerdere concurrenten zouden gebaat zijn bij dergelijke informatie.

Voor zover verzocht wordt de titel van het onderzoek te weigeren, stelt de CCD vast dat daartoe onvoldoende aanleiding bestaat nu de informatie reeds volgt uit de andere openbaar te maken of gemaakte informatie.

Ten aanzien van de documenten bij NTS2015225 wordt het model op bladzijde 30 (bijlage 2 bij het aanvraagformulier, document 1) geweigerd op grond van onevenredige benadeling. Het model is innovatief van opzet en achterliggende logica. Het concept dat ten grondslag ligt aan de opzet van het model kan leiden tot unieke onderzoeksbevindingen met publicaties in toonaangevende tijdschriften, hetgeen voor de wetenschappelijke carrière van de onderzoeker van groot belang is. Hij heeft het recht om als eerste zijn onderzoeksresultaten te publiceren. Vroegtijdige openbaarmaking van deze informatie schaadt zijn carrière en de nieuwsaarde van zijn onderzoek. Ook voor de instelling is het weigeren van deze informatie van belang, omdat het gaat om patenteerbare uitvindingen.

Aangaande NTS2015222 heeft de vergunninghouder op vergelijkbare gronden eveneens aangegeven dat hij het recht heeft de verworven onderzoeksresultaten het eerst te publiceren. De gemarkeerde tekstdelen dienen derhalve tevens op grond van deze motivering geweigerd te worden.

In de inventarislijsten is per projectvergunning aangegeven welke documenten gedeeltelijk worden geopenbaard op grond van bovenstaande wettelijke weigeringsgrond.

### **Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk bestemd voor intern beraad**



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

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

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

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

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

In het onderhavige geval betreft het een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld, welke op de website van de CCD staan gepubliceerd. Op deze wijze is deze informatie reeds openbaar.

In de inventarislijsten behorende bij de projectvergunningen is aangegeven welke documenten gedeeltelijke worden geweigerd op grond van bovenstaande wettelijke weigeringsgrond.

### **Wijze van openbaarmaking**

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

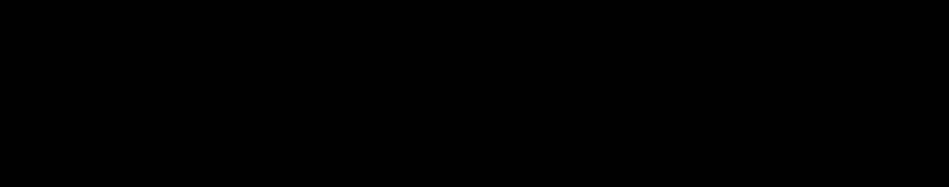
Dit kan door het indienen van een bezwaarschrift bij de CCD én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om – bij wijze van voorlopige voorziening – het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. De documenten die met dit besluit voor eenieder openbaar worden, zullen na afloop van bovengenoemde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

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

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,  
namens deze,



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **Bezwaar**

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

bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief. Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang. Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op [www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx](http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx) kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.





27 JUL 2015



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

|   |   |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
|---|---|--|--------------------------------|------------------------------|---|------------|--------------------|-----------------|----------|--------------------|---------------------------------------|----------------------|------------|--|-------------|------------|--|
| 1.1   | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen   |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| 1.2   | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | <table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>3 0 2 7 5 9 2 4</td> </tr> </table>   | Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht         | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                   | [REDACTED] | KvK-nummer         | 3 0 2 7 5 9 2 4 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Naam instelling of organisatie                      | Universiteit Utrecht  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| KvK-nummer  | 3 0 2 7 5 9 2 4   |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| 1.3   | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Instantie voor Dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>12007</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>3501AA Utrecht</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL27INGB0000425267</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>Universiteit Utrecht</td> </tr> </table>  | Straat en huisnummer           | Instantie voor Dierenwelzijn | Postbus   | 12007      | Postcode en plaats | 3501AA Utrecht  | IBAN     | NL27INGB0000425267 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht |            |  |             |            |  |
| Straat en huisnummer                                | Instantie voor Dierenwelzijn  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Postbus   | 12007   |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Postcode en plaats                                  | 3501AA Utrecht  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| IBAN  | NL27INGB0000425267  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Universiteit Utrecht  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| 1.4   | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | <table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table> | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED]                   | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie    | [REDACTED]         |                 | Afdeling | [REDACTED]         |                                       | Telefoonnummer       | [REDACTED] |  | E-mailadres | [REDACTED] |  |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Functie   | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Afdeling  | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| 1.5   | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | <table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table> | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED]                   | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie    | [REDACTED]         |                 | Afdeling | [REDACTED]         |                                       | Telefoonnummer       | [REDACTED] |  | E-mailadres | [REDACTED] |  |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Functie   | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Afdeling  | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |  |                                |                              |   |            |                    |                 |          |                    |                                       |                      |            |  |             |            |  |



- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- (Titel) Naam en voorletters  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 0 1 \_ 0 8 \_ 2 0 1 5
- Einddatum 3 1 \_ 0 7 \_ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Individuele verschillen in beloning en cognitie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

27 JUL 2015



Instantie voor  
**Dierenwelzijn**  
Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

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

uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 22 juli 2015  
onderwerp Aanvraag projectvergunning

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag. *x2*

#### Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA Utrecht.

#### Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

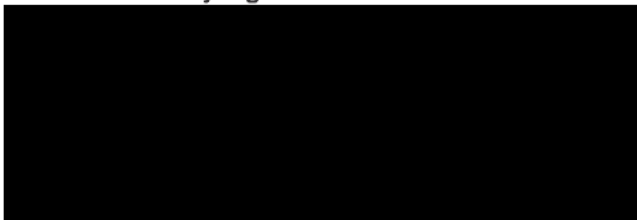
#### **Factuuradres**

UU -ASC  
postbus 80.011  
3508 TA Utrecht  
o.v.v. **CB.841910.3.01.011**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende e-mail adres: [info.ascf@uu.nl](mailto:info.ascf@uu.nl).

Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 22 juli 2015.

Met vriendelijke groet



**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.I.818.011  
2. Titel van het project : Individuele verschillen in beloning en cognitie  
3. Titel van de NTS : Individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 21-05-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 03-06-2015  
 anderszins behandeld: per email 19-06-2015 en 14-07-2015  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 09-06-2015 tot 19-06-2015, 09-07-2015 tot 10-07-2015,  
10-07-2015 tot 13-07-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 17-07-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 09-06-2015, 09-07-2015, 10-07-2015
- Strekking van de vraag / vragen:  
NTS, 09-06-2015:

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: De DEC adviseert u voorzichtig te zijn met uitspraken met betrekking tot toepassing van de resultaten in de mens, gezien het feit dat er sprake is van fundamenteel onderzoek.
- 3.6 Bestemming dieren na afloop: Er wordt genoemd wat de bestemming van de dieren niet is. De DEC verzoekt u te noemen wat er wel gebeurt met de dieren. Graag aanpassen.

Projectvoorstel, 09-06-2015:

- 3.1, achtergrond: Kunt u in iets meer detail aangeven wat het (bredere) doel is van het ZonMW-project waarin u participeert en welke bijdrage u met uw onderzoek levert aan dat project? Dit zou de commissie kunnen helpen bij het goed inschatten van het belang van uw projectaanvraag.
- 3.1, achtergrond: U noemt een aantal keer wat er al bekend is, wat de vraag oproept wat dit onderzoek dan toevoegt. De DEC verzoekt u te verwoorden wat de nog onbekende factoren zijn die nog onderzocht moeten worden. Dit geldt ook voor de Niet Technische Samenvatting. Graag aanpassen.
- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u, wanneer u wilt spreken over het (toekomst)perspectief met betrekking tot behandeling, dit meer te specificeren. In dat geval zou u ook 'translationeel' moeten aanvinken bij 2.1. De DEC wil u er echter ook op wijzen dat u de tekst in zijn geheel weg zou kunnen laten, omdat het hier gaat om fundamenteel onderzoek.
- 3.1, achtergrond: De DEC raadt u aan in het projectvoorstel, aan te geven waarom uw onderzoek zich specifiek richt op de relatie tussen individuele gedragskenmerken en de verslavingsgevoeligheid en waarom een aantal andere factoren buiten beschouwing gelaten worden.
- 3.2, doel: De DEC verzoekt u duidelijker uit te leggen wat u bedoelt met respectievelijk primaire werkingsmechanismen en onderliggende mechanismen. Graag aanpassen.
- 3.4 onderzoeksstrategie: De onderzoeken naar cocaïne en alcohol worden beschouwd als twee verschillende experimenten. De DEC verzoekt u daarom twee verschillende bijlagen te schrijven. Graag aanpassen.

Bijlage 1:

- K. Classificatie van ongerief: De DEC is van mening dat er wel degelijk sprake is van ontwenning en verzoekt u dit op te nemen in de tekst, waarbij u ook het ongerief classificeert.

NTS en Projectvoorstel, 09-07-2015:

- 1ste alinea op pag. 3, laatste regel: *kunnen bijdragen* moet zijn *gerelateerd aan*. De eerste zin van de volgende alinea geeft dit ook aan. Ook in de voorlaatste zin van deze alinea wordt duidelijk dat oorzaak en gevolg nog niet duidelijk zijn (daar gaat het project juist over) en dus ook nog niet van een *bijdrage*, maar van een *relatie* gesproken moet worden. Graag aanpassen in 3.1 van het projectvoorstel en de NTS.

Projectvoorstel, 10-07-2015:

- Zie vraag van 09-07-2015. In de laatste zin van de 2<sup>e</sup> alinea op pag. 3 is *een bijdrage* nog niet gewijzigd in *een relatie*.
- Bijlage 1 en 2, K. Classificatie van ongerief: Graag opnemen dat individueel huisvesten licht ongerief veroorzaakt.

- Datum antwoord: 19-06-2015, 10-07-2015, 13-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

NTS, 19-06-2015:

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Om verwarring te voorkomen zijn de zinnen over uiteindelijke toepassing bij de mens uit de NTS verwijderd.
- 3.6 Bestemming dieren na afloop: Goed punt. Omdat de dieren niet voor deze proef gedood hoeven worden is nu aangegeven dat 'de dieren na afloop van het experiment als surplus worden aangeboden'.

Projectvoorstel, 19-06-2015:

- 3.1, achtergrond: Deze aanvraag betreft geen onderzoek dat direct onder het ZonMW project valt. Er is een zin ingevoegd in de eerste alinea van de achtergrond, waarin wordt aangegeven dat het belang van onderzoek naar controleverlies over middelengebruik onderstreept wordt door het feit dat onderzoeker voor neurobiologisch onderzoek naar controleverlies een grote subsidie van ZonMW heeft ontvangen.
- 3.1, achtergrond: Dit is een goed punt, dank voor deze input. De tekst is aangepast en het is duidelijker toegelicht in de aanvraag en de NTS. De aanpassing in 3.1 achtergrond projectvoorstel is als volgt: Hoewel deze studies suggereren dat sociaal spel, cue reactiviteit en impulsiviteit kunnen bijdragen aan gevoeligheid voor (alcohol)verslaving tonen ze dit nog niet direct aan. Recent zijn we daarom ... Dit moet nog nader onderzocht worden en vormt een deel van het doel voor dit project. Verder weten we nog niet of impuls controle, aandacht, cue reactiviteit en emotioneel gedrag zoals angst bijdragen aan de individuele gevoeligheid voor verslaving of een gevolg is van middelengebruik. Dit wordt in dit project systematisch onderzocht.
- 3.1, achtergrond: Dit onderzoek is fundamenteel van aard. Verwijzingen naar toepassing zijn nu zoveel mogelijk beperkt zoals geadviseerd.
- 3.1, achtergrond: Er is in dit projectvoorstel gekozen voor een systematische aanpak, waarbij er steeds naar de relatie tussen 1 of enkele gedragskenmerken en de gevoeligheid voor verslaving gekeken wordt. Dit heeft praktische redenen – onderzoekers kunnen niet alle aspecten bepalen met de modellen die ze hebben en onderzoekers kunnen sommige aspecten ook niet in combinatie onderzoeken omdat bepaalde gedragstesten, zoals een aandachttaak en een werkgeheugentaak bijvoorbeeld, elkaar

kunnen beïnvloeden doordat ze gebruik maken van een zelfde beloner, die door een voorafgaande taak een andere waarde zou kunnen hebben gekregen voor dieren met een hoge of lage gevoeligheid voor verslaving. Dit zou een confound voor de studie betekenen.

- 3.2, doel: Met primaire werkingsmechanismen wordt bedoeld de directe aangrijpingspunten van alcohol en cocaïne. Cocaïne beïnvloedt dopamine transmissie door aan de dopamine heropname transporter (DAT) te binden en deze te remmen, waardoor er meer dopamine in de synaptische spleet blijft. Alcohol daarentegen werkt voornamelijk als allosterische modulator van GABA-receptoren, waardoor GABAerge neurotransmissie gestimuleerd wordt. Deze toelichting is aan de tekst toegevoegd om dit te verduidelijken en verder is 'primaire werkingsmechanismen' veranderd in 'primaire effecten op neurotransmissie'. Van 'onderliggende mechanismen' is 'neurobiologische mechanismen' gemaakt om verdere verwarring helemaal uit te sluiten.
- 3.4 onderzoeksstrategie: Er zijn nu aparte bijlagen geschreven voor alcohol (dierproef 1) en cocaïne (dierproef 2).

#### Bijlage 1:

- K. Classificatie van ongerief: Dit is aangepast. Er staat nog wel dat er geen zichtbare tekenen van ongerief zijn op basis van eerdere studies, maar dat licht ongerief door onttrekking niet kan worden uitgesloten.

#### NTS en Projectvoorstel, 10-07-2015:

- Deze punten zijn aangepast in de NTS en het projectvoorstel.

#### Projectvoorstel, 13-07-2015:

- Dit punt is nu aangepast.
- In de bijlagen voor deze aanvraag is reeds aangegeven dat individuele huisvesting licht ongerief kan veroorzaken, dit staat in een zin met voedselrestrictie vandaar dat er mogelijk overheen gelezen is.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

#### 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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

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

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
  - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het ophelderen van het verband tussen specifieke individuele, emotionele en cognitieve gedragskenmerken, sociale context en de gevoeligheid voor verslavingsgedrag. Deze fundamenteel wetenschappelijke studie zal niet direct leiden tot een effectievere behandeling van verslaafden. Verslaving, zowel aan alcohol als aan stimulerende stoffen, zoals cocaïne, vormt een belangrijk maatschappelijk probleem en veroorzaakt veel leed voor het verslaafde individu. Het door middel van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek verwerven van inzicht in de mechanismen die tot verslaving leiden en die maken dat sommige individuen daarvoor gevoeliger zijn dan anderen, is van groot belang. Een dergelijk kennisreservoir is onmisbaar voor toegepast en translationeel onderzoek dat voortbouwt op deze onderzoeksresultaten. Dit onderzoek kan er aan bijdragen dat beter begrepen en voorspeld kan worden waarom sommige personen wel verslaafd raken en andere niet. Ook kan het op termijn bijdragen aan het ontwikkelen van wetenschappelijk onderbouwde interventies bij de behandeling van patiënten met verslavingsproblemen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)



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

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. In bijlage 1 zullen de dieren solitair gehuisvest worden omdat anders de alcoholinname per rat niet bepaald kan worden. In bijlage 2 worden de dieren solitair gehuisvest omdat de ratten elkaars vena jugularis cannules kunnen beschadigen.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker in bijlage 1 - cumulatief - voor 60% van de dieren als licht ingeschat en voor de 40% van de dieren als matig (injecties, milde voetschokken, individueel huisvesten en voedselrestrictie). In bijlage 2 is het ongerief - cumulatief - ingeschat als matig (operatie, injecties, milde voetschokken, individueel huisvesten en voedselrestrictie). In eerste instantie had de onderzoeker aangegeven dat er geen sprake was van ontweningsverschijnselen als gevolg van het onttrekken van alcohol (bijlage 1) en cocaïne (bijlage 2). De DEC was echter van mening dat er wel degelijk sprake kan zijn van ongerief als gevolg van onthouding, ook al is dat misschien niet direct zichtbaar. Daarop heeft de onderzoeker in de aanvraag opgenomen dat, hoewel er op basis van voorgaande studies bij de gebruikte doseringen voor alcohol en cocaïne geen sprake is van zichtbare tekenen van ontweningsverschijnselen, niet kan worden uitgesloten dat de dieren toch licht ongerief ondervinden door onttrekking.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit project wordt onderzoek gedaan naar de mogelijke relatie tussen gedragskenmerken en de gevoeligheid voor verslaving. Vanwege de complexiteit van hersenmechanismen en gedrag is het niet mogelijk om dit in proefdierrijke alternatieven na te bootsen. Bovendien kunnen hersenmechanismen en gedrag bij proefdieren beter onderzocht worden dan bij mensen omdat bij dieren naar gedrag gekeken kan worden zonder invloed van externe factoren zoals cultuur, en omgevingsinvloeden en kan bij proefdieren het gedrag gemanipuleerd worden. Er wordt wel intensief samengewerkt met andere onderzoekers in Nederland die onderzoek doen naar verslaving bij mensen. Het door onderzoeker uitgevoerde proefdieronderzoek sluit nauw aan bij dit onderzoek bij mensen.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Voor het berekenen van het aantal benodigde dieren worden statistische methoden toegepast. Door verschillende gedragingen te bepalen in één dier en doordat de dieren in sommige gevallen hun eigen controle zijn, wordt het aantal dieren beperkt. Ook bij de farmacologische experimenten

kunnen de dieren hun eigen controle zijn. Daarnaast wordt steeds gekeken hoe ver men is met het onderzoek en of de doelstellingen al zijn bereikt. Als dat het geval is, kan volstaan worden met minder dieren dan het aantal dat is aangevraagd.

Het is helaas niet mogelijk om surplus dieren te gebruiken. Voor de gedragstaken in dit onderzoek is het van belang dat de dieren experimenteel naïef zijn. Daarnaast zijn voor het karakteriseren van spelgedrag dieren nodig op de leeftijd van 4-5 weken, hetgeen gebruik van surplus dieren bemoeilijkt. Voor het onderzoek is gekozen voor het gebruik van outbred (ratten) stammen, omdat daar de verslavingsgevoeligheid per individueel dier verschilt en de onderzoekers juist geïnteresseerd zijn in de relatie tussen verslavingsgevoeligheid en individuele gedragskenmerken (die voorspellend kunnen zijn voor die verslavingsgevoeligheid). Het gebruik van inbred ratten zou een bias kunnen veroorzaken, waardoor een incompleet beeld gegeven wordt van de verschillende gedragsaspecten, zoals die bij de mens te zien zijn, die het risico op verslaving bepalen. In dit project zal gebruik worden gemaakt van uitsluitend mannelijke dieren omdat verslaving significant meer voorkomt bij mannen. Het is bekend dat mannen en vrouwen verschillen in alcoholinname en omdat eerdere resultaten allemaal verkregen zijn uit mannelijke dieren, en in het kader van replicatie, is het daarom van belang om nu ook weer mannen te gebruiken.

Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzicht van de gekozen strategie en looptijd.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Vanwege de aard van de experimenten worden de dieren dagelijks intensief gecontroleerd door ervaren onderzoekers. Hierdoor kan de verzorging en eventuele pijnstilling goed op de dieren afgestemd worden. Na de operatie zal gebruik gemaakt worden van warmtematjes. Er wordt gebruik gemaakt van Lister Hooded ratten. Deze ratten zijn relatief intelligent en laten een natuurlijke mate van variatie in gedrag zien. Om die reden zijn deze ratten een bijzonder goed model voor het in dit projectvoorstel beschreven verslavingsonderzoek.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk inzicht verwerven in het verband tussen specifieke individuele emotionele en cognitieve gedragskenmerken, sociale context en de gevoeligheid voor verslavingsgedrag, substantieel is. De DEC is van mening dat gekozen is voor de juiste onderzoeksstrategie en dat de genoemde handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. De onderzoekers hebben goed beargumenteerd waarom zij in dit onderzoek alleen mannelijke outbred ratten willen gebruiken. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en

vermindering. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar.

Door het toedienen van injecties, de conditioneringstaken, het geven van milde voetschokken en de voedselrestrictie treedt in bijlage 1 bij 40% van de dieren en in bijlage 2 bij alle dieren matig ongerief op.

Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van het verwerven van inzicht in de factoren die mogelijk gerelateerd aan het verlies van controle over het gebruik van middelen als alcohol en cocaïne, opweegt tegen het ten hoogste matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translatie 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.

Middelenverslaving, aan stoffen zoals cocaïne of alcohol, vormt een groot medisch en maatschappelijk probleem. Meer dan 100 miljoen individuen wereldwijd kampen met middelenverslaving problematiek. Middelenverslaving vergroot het risico op secundaire aandoeningen, zoals hart en vaatziekten, verschillende vormen van kanker en verschillende psychiatrische aandoeningen. Verslaving is bijvoorbeeld verantwoordelijk voor meer dan 40% van de kosten die gemoe d zijn met alle grote neuropsychiatrische aandoeningen. Een belangrijk kenmerk van verslaving is controleverlies over middelengebruik. Verslaving is een hersenziekte; door adaptaties in de hersenen verliest een individu de capaciteit om zijn/haar middelengebruik te controleren. Het belang van onderzoek naar controleverlies blijkt onder meer uit het feit dat wij voor neurobiologisch onderzoek naar controleverlies over middelengebruik (andere projectaanvraag) een grote subsidie van ZonMW hebben ontvangen. Dit project is gericht op de relatie van sociale en cognitieve factoren met de grote mate van individuele verschillen in de gevoeligheid voor verslaving. Voor alcohol is bekend dat circa 80% van de volwassenen in westerse landen alcohol drinkt. De meeste individuen kunnen dit gecontroleerd doen, maar circa 5% van de mensen die alcohol gebruiken raakt verslaafd aan alcohol en verliest controle over middelengebruik, een kernkenmerk van verslaving. Er is echter maar weinig bekend over de factoren die deze individuele verschillen in verslaving bepalen. Wel weten we dat het risico op verslaving wordt bepaald door gedragskenmerken, omgevingsfactoren en genetische factoren.

De huidige behandelmethoden voor verslaving zijn beperkt in aantal en effectiviteit (*for review see O'Brien, 2008, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*; van den Brink, 2012, *Curr. Drug Abuse Rev.*). Bovendien zijn ze niet gericht op het herstellen van controle over middelengebruik, maar op het reduceren van de belonende effecten of craving naar verslavende middelen. Het is daarom van belang beter te begrijpen hoe verslaving en specifiek controleverlies, een kernkenmerk van verslaving, neurobiologisch tot stand komt en in stand gehouden wordt. Dit kennis kan uiteindelijk leiden tot nieuwe mogelijkheden om verslaving adequater te kunnen voorkomen. Bovendien kan dit onderzoek weer richting geven aan neurobiologisch onderzoek naar de biologische basis voor verslaving. In dit project ligt de focus op individuele verschillen in beloningsgevoeligheid en cognitieve processen, in relatie tot verslavingsgevoeligheid.

#### Eerdere resultaten

In de afgelopen jaren hebben wij veel geïnvesteerd in betrouwbare en relevante diermodellen voor verslaving. Wij hebben bijvoorbeeld laten zien dat dieren, na langdurig gebruik van cocaïne en alcohol, niet alleen veel van deze stoffen gebruiken maar ook controle over hun gebruik verliezen. Ze blijven bijvoorbeeld zoeken naar cocaïne en alcohol in conflictsituaties, waarin ze geconfronteerd worden met een waarschuwingssignaal dat een footshock voorspelt. En ze passen hun alcoholconsumptie niet aan als de alcohol een vieze smaak krijgt door middel van kinine toevoeging (Lesscher et al., 2010, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 34:1219-1225; Vanderschuren and Everitt, 2004, *Science* 305:1017-1019; Limpens et al., 2014, *Drug Alcohol Depend.* 142:314-24). Dit geeft aan dat de dieren compulsief gebruik van verslavende middelen ontwikkelen, een belangrijk kenmerk van verslaving. Bovendien zien we grote individuele verschillen in de gevoeligheid voor verslaving. In populaties Lister Hooded ratten kunnen we subgroepen van hoge en lage alcohol drinkende dieren onderscheiden. Recent hebben we bovendien gevonden dat hoge alcohol drinkende ratten sneller minder gevoelig worden voor kinine toevoeging en voor een waarschuwingssignaal dat een footshock voorspelt, wat erop wijst dat deze dieren middelengebruik laten zien ondanks negatieve consequenties, dat indicatief is voor compulsief middelengebruik. Deze resultaten zijn recent opgestuurd voor publicatie.

Deze modellen stellen ons in staat om de mechanismen van en individuele variatie in de gevoeligheid voor verslaving te onderzoeken. Hierin zijn wij met name geïnteresseerd in de rol van emotionele en cognitieve factoren. Individuele verschillen in en verstoringen van emotie en cognitie zijn bepalend voor functioneel gedrag en kunnen risicofactoren vormen voor psychiatrische problemen, waaronder verslaving. Wij hebben hier inderdaad aanwijzingen voor uit recent onderzoek en de literatuur. Zo is bijvoorbeeld aangetoond dat deprivatie van sociaal spel op jonge leeftijd lange termijn consequenties heeft voor verslavingsgevoeligheid en impulscontrole. Spel is belonend voor dieren en deze resultaten laten zien dat niet kunnen spelen leidt tot verhoogde verslavingsgevoeligheid en verminderde impulscontrole (bijv. Baarendse et al., 2013, *Neuropsychopharmacology* 38: 1485-1494; Baarendse et al., 2014, *Psychopharmacology* 231: 1695-1704; Lesscher et al., submitted). Daarnaast hebben we ook gevonden dat hoge alcohol drinkende ratten gevoeliger zijn voor cues die geassocieerd zijn met sucrose beloningen en dat hoge alcohol drinkende ratten impulsiever zijn dan lage alcohol drinkende ratten (Spoelder et al., nog niet gepubliceerd). Hoewel deze studies suggereren dat sociaal spel, cue reactiviteit en impulsiviteit gerelateerd zijn aan gevoeligheid voor (alcohol)verslaving tonen ze dit nog niet direct aan.

Recent zijn we daarom gestart met experimenten waarbij we kijken naar de relatie tussen sociaal spel gedrag op jonge leeftijd en alcohol gebruik in volwassenheid.

Verder weten we nog niet goed hoe impulscontrole, aandacht, cue reactiviteit en emotioneel gedrag zoals angst gerelateerd zijn aan de individuele gevoeligheid voor verslaving of een gevolg is van middelengebruik. Dit wordt in dit project systematisch onderzocht.

Alcohol wordt vaak in een sociale context geconsumeerd. Sterker nog, de sociale context en sociale druk om alcohol te drinken zijn belangrijke factoren die de mate van alcoholconsumptie door een individu bepalen (bijv. Perkins, 2002; Homish and Leonard, 2008; Lau-Barraco et al., 2012). Recent dierexperimenteel werk heeft laten zien dat woelmuizen bijvoorbeeld ook hun alcoholconsumptie gedrag aanpassen aan dat van een soortgenoot (Anacker et al., 2011). Om deze reden willen wij ook sociale context als factor meenemen in ons onderzoek naar individuele gevoeligheid voor verslavingsgedrag.

Samengevat hebben wij belangrijk voorwerk gedaan in de afgelopen jaren waarin we laten zien dat we met behulp van de rat als diemodel onderzoek kunnen doen naar individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid, met behulp van relevante modellen voor controleverlies over middelengebruik, en de rol van emotionele en cognitieve processen hierin.

In dit project worden deze strategieën geïntegreerd om beter te begrijpen welke emotionele en cognitieve factoren bepalend zijn voor verslavingsgevoeligheid. We richten ons in dit project primair op cocaïne en alcohol, vanwege het sterke verslavende vermogen van deze middelen en de enorme maatschappelijke schade die de misbruik van deze middelen veroorzaakt. Daarentegen zijn de primaire werkingsmechanismen verschillend. Bovendien is cocaïne illegaal terwijl het gebruik van alcohol legaal en zelfs breed geaccepteerd is in onze maatschappij. Verder is preklinisch onderzoek naar controleverlies over middelen gebruik voornamelijk gericht op cocaïne en alcohol, maar is niet duidelijk of de onderliggende mechanismen voor controleverlies over het gebruik van cocaïne en alcohol vergelijkbaar is.

### 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 vraag(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

De in dit project beschreven experimenten hebben als doel om op te helderen wat het verband is tussen specifieke individuele emotionele en cognitieve gedragskenmerken, sociale context en de gevoeligheid voor verslavingsgedrag.

Hiervoor zullen we ratten karakteriseren op verschillende emotionele en cognitieve gedragskenmerken (spelgedrag, angst, gevoeligheid voor natuurlijke beloningen zoals sucrose, cognitief vermogen, cognitieve flexibiliteit, impuls controle, aandacht, compulsiviteit). Dezelfde ratten worden later getest op verslavingsgevoeligheid (alcohol en cocaïne) om het verband tussen specifieke gedragskenmerken en verslavingsgevoeligheid te bepalen.

Om inzicht te krijgen in de invloed van sociale context op verslavingsgevoeligheid in relatie tot emotionele en cognitieve gedragskenmerken laten we, in een deel van de experimenten, de ratten in een sociale of individuele context alcohol consumeren. Daarnaast zullen we soms gebruik maken van farmaca, die specifieke gedragskenmerken en betrokken neurobiologische systemen beïnvloeden, om nader te bepalen wat de relatie is tussen specifieke gedragskenmerken en verslavingsgevoeligheid en de betrokken neurobiologische systemen.

We richten ons in dit project primair op cocaïne en alcohol, vanwege het sterke verslavende vermogen van deze middelen en de enorme maatschappelijke schade die de misbruik van deze middelen veroorzaakt. Daarentegen zijn de primaire effecten van cocaïne en alcohol op neurotransmissie verschillend (cocaïne remt de dopamine heropname transporter, terwijl alcohol voornamelijk werkt als allosterische modulator van GABA receptoren), en is cocaïne illegaal terwijl het gebruik van alcohol legaal en zelfs breed geaccepteerd is in onze maatschappij. Verder is preklinisch onderzoek naar controleverlies over middelen gebruik voornamelijk gericht op cocaïne en alcohol, maar is niet duidelijk of de neurobiologische mechanismen voor controleverlies over het gebruik van cocaïne en alcohol vergelijkbaar is.

Wij hebben alle expertise en methoden in huis (zie ook 3.1, achtergrond) om deze experimenten uit te voeren. Wij werken intensief samen met nationale partners, die onderzoek doen naar verslaving bij mensen. Ons proefdierexperimenteel werk sluit nauw aan bij dit onderzoek, en is in die zin vertaalbaar naar humaan werk.

### **3.3 Belang**

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

De in dit project beschreven experimenten zijn gericht op het ophelderen van de factoren die individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid bepalen.

Middelenverslaving, aan stoffen zoals cocaïne of alcohol, vormt een groot medisch en maatschappelijk probleem. Meer dan 100 miljoen individuen wereldwijd kampen met middelenverslaving problematiek. Middelenverslaving is verantwoordelijk voor meer dan 40% van de financiële kosten die gemoeid zijn met alle grote neuropsychiatrische aandoeningen. Een belangrijk kenmerk van verslaving is controleverlies over middelengebruik. Ondanks de hoge medische, maatschappelijke en economische kosten van middelenverslaving zijn de bestaande behandelmethoden voor verslaving beperkt in aantal en effectiviteit. Bovendien zijn de bestaande behandelmethoden vooral gericht op het verlagen van de belonende effecten van verslavende stoffen en niet op het herstellen van controle over middelengebruik. Daarnaast is er nog weinig bekend over de factoren die de hoge mate van individuele variatie in het ontstaan van verslaving bepalen. Dit onderzoek zal inzicht geven in factoren die bepalend zijn voor verslavingsgevoeligheid.

Opheldering van deze factoren is van groot belang voor het ontwikkelen van preventieve maatregelen gericht op het voorkomen van verslaving en uiteraard ook voor het ontwikkelen van verbeterde strategieën om deze desastreuze hersenziekte te behandelen.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

In dit project wordt het verband onderzocht tussen individuele emotionele en cognitieve gedragskenmerken, sociale context en de gevoeligheid voor

verslavingsgedrag.

De algemene opzet is vergelijkbaar voor alle experimenten in dit project:

1. De dieren worden eerst gekarakteriseerd op een of meerdere emotionele en cognitieve gedragskenmerken
2. De ratten worden getest op verslavingsgevoeligheid voor alcohol of cocaïne

Het doel van deze strategie is steeds om de relatie tussen specifieke gedragskenmerken met verslavingsgevoeligheid te bepalen. Afhankelijk van de gedragstaak en specifieke vraagstelling van het experiment worden soms gedragstaken gecombineerd in een dierexperiment. Zo kunnen we bijvoorbeeld de relatie tussen sociaal spelgedrag, angstgedrag en verslavingsgevoeligheid onderzoeken of de relatie tussen impuls controle, compulsiviteit en verslavingsgevoeligheid.

De rol van specifieke emotionele en cognitieve gedragskenmerken en achterliggende neurobiologische processen wordt in sommige gevallen ook gevalideerd met behulp van psychofarmaca, die specifiek gedragskenmerken en/of neurobiologische systemen beïnvloeden.

(zie 3.4.2. voor verdere details).

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

De ratten worden eerst gekarakteriseerd op een of meerdere emotionele en cognitieve gedragskenmerken met behulp van verschillende gedragstaken:

- Sociaal spelgedrag: observatie van spel tussen 2 jonge ratten (21-42 dagen oud). Voor spelgedrag worden gedragingen gescoord die kenmerkend zijn voor spel bij jonge dieren, zoals pinning, pouncing, volgen, sociale exploratie of poetsgedrag.
- Gevoeligheid voor sociale beloning: met behulp van een operante taak wordt bepaald hoe veel moeite de ratten willen doen om toegang te krijgen tot een spelpartner. Deze methode is recent gevalideerd in ons lab. Het aantal actieve pedaaldrukken geeft informatie over de gevoeligheid van een rat voor de belonende effecten van spelgedrag alsmede de motivatie voor sociaal spelgedrag.
- Angst: observatie van gedrag in plus maze of open veld. Hierbij wordt het aantal entries in en de tijd die de dieren doorbrengen in de veilige (gesloten, randen) en risicovolle gebieden (open, midden) gescoord.
- Cognitief vermogen, impuls controle en aandacht:  
Holeboard, set-shifting, 5-choice serial react on time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak. Hierbij wordt gekeken naar het aantal goede en foute keuzes die de dieren maken (cognitie, aandacht) en naar het aantal premature responsen dat de dieren maken (impuls controle).
- Compulsiviteit zal met twee verschillende taken bepaald worden:
  - a) Habitueel operant zoekgedrag naar een aangename voedselbeloner zoals sucrose, chocolade of zoete gecondenseerde melk dat geïnduceerd wordt door een periode van vrije toegang tot deze voedselbeloner in de thuishoek, gevolgd door operante zelftoediening voor deze beloner met random-interval schema's. De mate van compulsiviteit wordt bepaald door de dieren voor een zelftoediening sessie te verzadigen door een voorafgaande periode van een tot enkele uren vrije toegang tot de voedselbeloner in de thuishoek. Een dier dat gewoontegedrag vertoont zal zijn zoekgedrag in de operante taak niet aanpassen, ook al is het dier verzadigd.
  - b) Schema-geïnduceerde polydipsie (SIP), waarbij ratten beperkt voedsel aangeboden krijgen volgens een bepaald schema terwijl ze water kunnen



consumeren. Deze procedure leidt tot overdreven consumptie van water. SIP is een goed geaccepteerd en gevalideerd model voor OCD (zie bijv. d'Angelo et al, 2014, CNS Spectrums).

Na karakterisatie (of in sommige gevallen ervoor, afhankelijk van de vraagstelling) van de dieren op een of meerdere van deze gedragskenmerken worden de dieren getest op verslavingsgevoeligheid voor alcohol of cocaïne.

Voor het bepalen van verslavingsgevoeligheid voor alcohol krijgen de dieren eerst in de thuishooi een vrije keuze tussen water en alcohol gedurende een periode van minimaal 8 opeenvolgende weken. Hierna wordt bepaald of de dieren verslavings-achtig gedrag vertonen. Hiervoor kan gebruik gemaakt worden van kinine modulatie, waarbij oplopende concentraties van de bittere stof kinine aan de alcoholoplossing worden toegevoegd. Een andere strategie die we recent hebben geïmplementeerd is geconditioneerde suppressie, waarbij dieren worden getraind om op een pedaal te drukken om toegang te krijgen tot alcohol in operante kooien. Vervolgens wordt bepaald in welke mate een dier zijn zoekgedrag naar alcohol aanpast als een waarschuwingssignaal, dat door angst conditionering, een footshock voorspelt, wordt gepresenteerd tijdens een zelftoedieningssessie. Verlies van geconditioneerde suppressie wijst op controleverlies over alcoholgebruik, ofwel compulsief alcoholgebruik.

Bij een deel van deze alcoholexperimenten gaan we de ratten in een sociale of individuele context alcohol laten consumeren, teneinde ook uitspraken te kunnen doen over het belang van de sociale context voor verslavingsgevoeligheid.

Voor cocaïne wordt een vergelijkbare strategie gehanteerd. Hier worden de dieren echter zonder voorafgaande periode van consumptie in de thuishooi getraind in de operante zelftoediening, waarbij cocaïne intraveneus wordt toegediend aan de dieren zodra ze een correcte (actieve) pedaaldruk maken. Om te bepalen of de dieren verslavings-achtig gedrag vertonen wordt ook hier gebruik gemaakt van geconditioneerde suppressie, waarbij bepaald wordt in welke mate een dier zijn zoekgedrag naar cocaïne aanpast als een waarschuwingssignaal, dat een footshock voorspelt, wordt gepresenteerd tijdens een zelftoedieningssessie. Verlies van geconditioneerde suppressie wijst op controleverlies over cocaïne gebruik.

Om nader te bepalen wat de relatie is tussen specifieke gedragskenmerken en verslavingsgevoeligheid wordt in een deel van de experimenten gebruik gemaakt van psychofarmaca, die invloed hebben op het beloningssysteem (dopamine receptor (ant)agonist, mu-opioid receptor (ant)agonist, cannabinoid receptor (ant)agonist, dopamine heropname remmer, cannabinoid afbraak remmer, N-acetyl-cysteine), hunkering (N-acetyl-cysteine, anti-epileptica zoals topiramaat), emotionele processen (GABA-A receptor (ant)agonist, GABA-B receptor (ant)agonist, benzodiazepines), cognitieve processen (AMPA receptor (ant)agonist, metabotrope glutamaat receptor (ant)agonist, noradrenaline receptor (ant)agonist, noradrenaline heropname remmer,) en compulsief gedrag (serotonine receptor (ant)agonist, serotonine heropname remmer) en eventuele andere stoffen die nog als belangrijke targets voor het herstellen van controle over middelengebruik naar voren komen. De stoffen worden toegediend voor de geconditioneerde suppressietest (voor bepaling van compulsief alcohol of cocaïne gebruik), in een within-subjects design wat betekent dat de dieren hun eigen controle zijn.

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

De in 3.4.2. beschreven gedragskarakterisaties worden gefaseerd uitgevoerd, soms in parallel, en in verband gebracht met verslavingsgevoeligheid, voor alcohol of voor cocaïne. De uitkomsten van deze verschillende experimenten worden vervolgens individueel, maar op de lange termijn ook integraal, geanalyseerd om breed inzicht te krijgen in factoren die bijdragen aan verslavingsgevoeligheid, met een focus op controleverlies over middelengebruik.

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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Gedragskarakterisatie en verslavingsgevoelighe d alcohol |
| 2          | Gedragskarakterisatie en verslavingsgevoelighe d cocaine |
| 3          |  |
| 4          |  |
| 5          |  |
| 6          |  |
| 7          |  |
| 8          |  |
| 9          |  |
| 10         |  |



Centrale Commissie Dierproeven



Centrale Commissie Dierproeven i.o.

6.

## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Gedragskarakterisatie en verslavingsgevoelighe d alcohol |
- Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimenten in dit project hebben tot doel om op te helderen wat het verband is tussen individuele emotionele en cognitieve gedragskenmerken, sociale context en de gevoeligheid voor verslavingsgedrag.

De overkoepelende hypothese is dat het risico op verslavingsgedrag wordt bepaald door emotionele en cognitieve gedragsaspecten, die met elkaar in verband staan. Zo verwachten we dat de gevoeligheid voor sociale beloning zal samenhangen met aandacht, impulscontrole en/of angstgedrag, factoren die allen bij kunnen dragen aan verslavingsgevoeligheid.

Om deze hypothese en onderliggende specifieke hypothesen te kunnen toetsen worden individuele dieren gekarakteriseerd op een of meerdere emotionele en/of cognitieve gedragskenmerken met behulp van verschillende gedragstaken.

- Sociaal spelgedrag: observatie van spel tussen 2 jonge ratten (21-42 dagen oud). De primaire uitkomstparameters zijn: pinning (tijdens sociale interactie rolt een dier met de rug tegen de grond en partner buigt eroverheen) en **pouncing** (met de neus de nek van de partner aanraken, 'uitdagend' gedrag voorafgaand aan **pinning**), gedragingen karakteristiek voor sociaal spelgedrag van jonge dieren.
- Gevoeligheid voor sociale beloning: met behulp van een operante taak wordt bepaald hoe veel moeite de ratten willen doen om toegang te krijgen tot een spelpartner. Deze methode is recent gevalideerd in ons lab. De primaire uitkomstparameter is hierbij: het **aantal actieve pedaaldrukken**, dat informatie geeft over de gevoeligheid van een rat voor de belonende effecten van spelgedrag alsmede de motivatie voor sociaal spelgedrag.
- Angst: observatie van gedrag in plus maze of open veld. De primaire uitkomstparameters zijn hierbij het **aantal entries** in en de **tijd** die de dieren doorbrengen in de veilige (gesloten, randen) en risicovolle gebieden (open, midden).
- Cognitief vermogen, impuls controle en aandacht:  
Holeboard, set-shifting, 5-choice serial react on time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak. Hierbij wordt gekeken naar twee primaire uitkomstparameters: het **aantal goede en foute keuzes en responsen** die de dieren maken (cognitie, aandacht) en naar het **aantal premature responsen** dat de dieren maken (impuls controle).
- Compulsiviteit:
  - a) habitueel operant zoekgedrag naar een aangename voedselbeloner zoals sucrose, chocolade of zoete gecondenseerde melk dat geïnduceerd wordt door een periode van vrije toegang tot deze voedselbeloner in de thuishooi, gevolgd door operante zelftoediening voor deze beloner met random-interval schema's. De mate van compulsiviteit wordt bepaald door de dieren voor een zelftoediening sessie te verzadigen door een voorafgaande periode van een tot enkele uren vrije toegang tot de voedselbeloner in de thuishooi. Hierbij zijn de **mate van responderen op de actieve pedaal danwel het zoeken naar een beloning** de primaire uitkomstparameters.
  - b) Schema-geïnduceerde polydipsie (SIP), waarbij ratten beperkt voedsel aangeboden krijgen volgens een bepaald schema terwijl ze water kunnen consumeren. De **overdreven consumptie van water** is de kritische parameter in deze test, dat als goed gevalideerd model voor OCD gebruikt wordt (zie bijv. d'Angelo et al, 2014, CNS Spectrums).

Na karakterisatie (of in sommige gevallen ervoor, afhankelijk van de vraagstelling, bijv. is een gedragskenmerk een risico op of gevolg van middelengebruik) van de dieren op een of meerdere van deze gedragskenmerken worden de dieren getest op verslavingsgevoeligheid voor alcohol.

De combinatie van gedragstaken is afhankelijk van de specifieke vraagstelling. Enkele specifieke hypothesen die we hebben zijn:

Voor het bepalen van verslavingsgevoeligheid kan – voor alcohol - gebruik gemaakt worden van kinine modulatie, waarbij oplopende concentraties van de bittere stof kinine aan de alcoholoplossing worden toegevoegd. De verandering in alcoholinname en preferentie is hierbij de primaire uitkomstparameter, die aangeeft hoe flexibel de dieren zijn in het aanpassen van hun alcoholinname patroon.

De andere strategie die wij gebruiken om controle over middelengebruik te bepalen is geconditioneerde suppressie, waarbij dieren worden getraind om te drukken voor alcohol in operante kooien. Vervolgens wordt bepaald in welke mate een dier zijn zoekgedrag naar alcohol aanpast als een waarschuwingssignaal, dat door angst condit ionering, een footshock voorspelt, wordt gepresenteerd tijdens een zelftoedieningssessie. **Verlies van geconditioneerde suppressie**, dat bepaald wordt door vergelijking van geconditioneerde en niet-gecondit oneerde dieren in dezelfde behandelgroep, wijst op controleverlies over ofwel compulsief alcohol gebruik.

Bij een deel van de alcohol experimenten laten we de ratten in een sociale of individuele context alcohol consumeren, om ook uitspraken te kunnen doen over het belang van de sociale context voor verslavingsgevoeligheid. Daarnaast wordt in een deel van de experimenten gebruik gemaakt van psychofarmaca om de neurobiologische basis voor verschillen in gevoeligheid voor alcoholverslaving nader te onderzoeken. De psychofarmaca die gebruikt zullen worden zijn stoffen die invloed hebben op het beloningsstelsel (dopamine receptor (ant)agonist, mu-op oid receptor (ant)agonist, cannabinoid receptor (ant)agonist, dopamine heropname remmer, cannabinoid afbraak remmer, N-acetyl-cysteine), hunkering (N-acetyl-cysteine, anti-epileptica zoals topiramaat), emotionele processen (GABA-A receptor (ant)agonist, GABA-B receptor (ant)agonist, benzodiazepines), cogn tieve processen (AMPA receptor (ant)agonist, metabotrope glutamaat receptor (ant)agonist, noradrenaline receptor (ant)agonist, noradrenaline heropname remmer,) en compulsief gedrag (serotonine receptor (ant)agonist, serotonine heropname remmer) of zijn stoffen die nog als belangrijke targets voor het herstellen van controle over middelengebruik naar voren komen. De stoffen worden toegediend voor de geconditioneerde suppressietest (voor bepaling van compulsief alcohol gebruik), in een within-subjects design wat betekent dat de dieren hun eigen controle zijn en dat er voor de farmacologische behandeling geen extra dieren nodig 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.

- Scoren van sociaal spelgedrag: observatie van spel tussen 2 jonge ratten (21-42 dagen oud) in 15 minuten durende sessies na een isolatieperiode van 2-24 uur. Twee metingen per dier.
- Korte gedragstesten: plus maze of open veld (eenmalige testen, max. 30 minuten per test)
- Holeboard test: 20-30 trials per dier, max. 5 minuten per trial.
- Voedselrestrictie: 85-90% van het vrijvoer gewicht om de dieren gemotiveerd te maken voor de operante taak; dagelijks maar zodanig dat het lichaamsgewicht niet meer dan 10% daalt ten opzichte van de groeicurve.
- Uitvoeren operante taak (sociale beloning, set-shifting, 5-choice serial react on time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak of compulsiviteit): dagelijks 16 weken
- Sociale isolatie – kortdurend (2-24 uur) voorafgaand aan de spel experimenten en langdurig (weken) voor alcohol experimenten (om individuele vloeistofinname te kunnen bepalen)

- Alcoholconsumptie in de thuishooi (8-16 weken; de dieren krijgen gedurende deze periode twee flessen aangeboden in de thuishooi, 1 gevuld met water en 1 gevuld met 10-20% alcohol in water). In sommige gevallen zullen we dieren in een sociale nabijheid laten drinken, gescheiden door een perspex wand met gaatjes, de verdere procedures zijn vergelijkbaar.
- Operante zelftoediening voor alcohol (max. 20 weken)
- Trainen van de dieren voor geconditioneerde suppressie: toon associaties met milde voetschokken (0.3-0.5 mA, gemiddeld 1 per minuut in 10 minuten durende sessies; max. 4 sessies per dier, bij de helft van de dieren). Milde voetschokken geven kortdurend licht ongerief.
- Geconditioneerde suppressie test: alcohol zelftoediening met/ zonder toon (4-12 sessies per dier)
- Systemische injectie van psychofarmaca (intraperitoneaal of subcutaan, max. 15 per dier met minimaal 24 uur tussen twee injecties. Aantal injecties en toedieningsweg is afhankelijk van de stof)

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

Bij het bepalen van het aantal dieren gaan we uit van eerdere resultaten uit onze eigen onderzoeksgroep, waarin een grote mate van natuurlijke individuele variatie in alcoholinname, spelgedrag en cognitief vermogen is aangetoond in Lister Hooded ratten.

De belangrijkste parameter in deze experimenten is steeds de mate van controle over alcohol-zoekgedrag, die blijkt uit de mate van geconditioneerde suppressie in het aantal responsen die de dieren maken voor alcohol of cocaïne. Met een verwacht verschil van 4.6 responsen en een standaard deviatie van 4.2 is een groepsgrootte van 14 ratten nodig om de kans op vals negatieve resultaten tot minder dan 20% te reduceren (power van 80% en een alpha van 0.05). Deze berekening is gemaakt met behulp van de online power calculator (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>).

Omdat we juist geïnteresseerd zijn in de extremen, selecteren we per populatie de uiterste kwartielen op basis van gedragskenmerken of middelen gebruik, afhankelijk van de vraagstelling. Daarnaast is voor de geconditioneerde suppressie een niet-geconditioneerde controlegroep (CS-) nodig. Dit maakt dat voor ieder experiment in totaal  $14 * 2 (CS- \text{ en } CS+) * 4$  (kwartielen) = ~ 112 dieren nodig zijn.

Om de relatie tussen de genoemde individuele gedragskenmerken (7 operante taken en nog eens 4 sociaal drinkende groepen) met verslavingsgevoeligheid te onderzoeken zijn  $(7+4)*112 = 1232$  nodig. Hierbij is rekening gehouden met de mogelijkheid om in sommige gevallen verschillende gedragingen te kunnen bepalen in 1 dier, zoals sociaal spelgedrag en angstgedrag. Dit is afhankelijk van de vraagstelling (zie voorbeeld hypothesen in 2A) en van de gedragstaak. Zo is het bijvoorbeeld niet mogelijk om dezelfde dieren te testen in een 5-choice serial reaction time taak en in een delayed reward taak omdat deze testen elkaar kunnen beïnvloeden. Wij vragen nog 10% extra dieren aan, op basis van ervaring, voor de bepaling van optimale doseringen van farmaca, pilots voor eventuele aanpassingen gedragstaken en onverwacht uitval van dieren. In totaal zullen wij voor deze studie daarom  $1232+123 = 1355$  ratten nodig hebben.

## **B. De dieren**

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

1355 ratten, man, Lister Hooded.

Er bestaan uitstekende modellen met ratten om verslavingsgedrag te bestuderen. Wij hebben uitgebreide ervaring met het bestuderen van verslavingsgedrag bij ratten. De Lister Hooded populatie vertoont veel biologische variatie in gedrag, o.a. impulsiviteit en sociaal biologisch gedrag en verslavingsgedrag, die noodzakelijk is voor een aantal van onze wetenschappelijke benaderingen waarbij individuele variatie een rol speelt.

De goede cognitieve capaciteit van de Lister Hooded rat maakt deze rattenstam tevens zeer geschikt voor onze impulsiviteitstaken, waardoor de trainingsduur voor de taken korter is. Aangezien voorgaande studies gebaseerd zijn op resultaten met de Lister Hooded rattenstam, willen we het vervolgonderzoek hiermee voortzetten.

Wij kiezen bewust om in deze fase van ons onderzoek alleen mannen te gebruiken. De prevalentie van alcoholverslaving is veel groter in mannen dan in vrouwen; alcoholverslaving ongeveer twee keer zo vaak voor bij mannen dan bij vrouwen (bijv. Nationale Drugs Monitor 2011, Trimbos Instituut). Bovendien is het bekend dat mannen en vrouwen verschillen in de hoeveelheid alcoholinname. Deze sekse verschillen zou dit onderzoek in deze fase – dat als primaire doel heeft om te bepalen wat de mechanismen zijn die bijdragen aan alcoholinname en alcoholverslaving – nadelig beïnvloeden. Ten derde is onze keuze ook methodologisch – de alcoholconsumptiemodellen die in de afgelopen periode ontwikkeld zijn en mede de basis vormen voor dit onderzoek zijn uitgevoerd in mannen. Indien we voor vrouwen zouden kiezen zou al dit voorwerk ook opnieuw uitgevoerd moeten worden, hetgeen in ieder geval in deze fase van de studie voorbij gaat aan het primaire doel van dit onderzoek. Afhankelijk van de uitkomsten van ons onderzoek zullen wij in de toekomst overwegen om ook naar vrouwen te kijken, maar de relatieve relevantie van onderzoek bij mannen is momenteel nog zo hoog dat we daar vooralsnog niet voor kiezen.

De dieren zullen allemaal jong binnenkomen (3 weken oud) om ze op spelgedrag, dat zich manifesteert in de 4e en 5e week van de rat, te kunnen karakteriseren.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, qua door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vermindering:

- In het kader van vermindering is het niet mogelijk om surplusdieren te gebruiken. Voor de gedragstaken in dit onderzoek is het van belang dat de dieren experimenteel naïef zijn, dus niet eerder zijn getest of blootgesteld aan farmaca. Bovendien worden voor deze experimenten de dieren op spelgedrag gekarakteriseerd, op de leeftijd van 4-5 weken, hetgeen gebruik van surplus dieren bemoeilijkt.

- Er is zoveel mogelijk gekozen voor outbred (ratten) stammen omdat we juist geïnteresseerd zijn in de natuurlijke mate van individuele verschillen tussen dieren in verslavingsgevoeligheid in relatie tot individuele gedragskenmerken die voorspellend kunnen zijn voor verslavingsgevoeligheid. We kiezen er bewust niet voor om geselecteerde ratten stammen te vergelijken omdat deze geselecteerd zijn en daardoor een bias in zich hebben en niet meer een compleet beeld

geven van verschillende gedragsaspecten die het risico op verslaving bepalen, zoals we dat bij de mens zien.

- We gebruiken uitsluitend mannelijke dieren omdat verslaving vooral voorkomt bij mannen, het bekend is dat mannen en vrouwen verschillen in alcoholinname en omdat onze en andere eerdere resultaten allemaal verkregen uit mannelijke dieren, en in het kader van replicatie is het daarom van belang om nu ook weer mannen te gebruiken.
- Voor de farmacologische experimenten wordt gebruik gemaakt van een within-subjects design, waardoor elk dier als zijn eigen controle kan dienen. Dit is mogelijk omdat herhaaldelijk uitvoeren van geconditioneerde suppressietesten in voorgaand onderzoek betrouwbare resultaten heeft gegeven.
- We doen veelal meerdere gedragstesten in 1 dier, waardoor we minder dieren nodig hebben en bovendien een rijkere dataset krijgen en meer te weten komen over de inter-relatie tussen gedragskenmerken in de gevoeligheid voor verslaving.

#### Verfijning:

- Vanwege de aard van onze experimenten worden de dieren veelal dagelijks zeer intensief gecontroleerd door onderzoekers waar de dieren aan gewend zijn. Daardoor kunnen wij de verzorging en eventuele pijnstilling goed op de dieren afstemmen.
- Warmtematjes tijdens en na operatie
- Fysiologisch zout na operatie

#### Vervanging:

- Omdat we kijken naar gedrag, zijn er geen alternatieve (in vivo) methoden.
- Humaan onderzoek kan het hier beschreven onderzoek niet vervangen om verschillende redenen. Het is bijvoorbeeld bij mensen vaak niet mogelijk om het gebruik van een verslavend middel te onderzoeken zonder dat ook nog een ander verslavend middel (zoals nicotine, heroïne, amfetamine, ...) gebruik wordt. Bovendien bepalen externe factoren, zoals cultuur, omgevingsfactoren etc. vaak het gedrag van mensen zonder dat dit te achterhalen is. Daarnaast is het niet mogelijk om met behulp van farmaca gedrag te beïnvloeden op een gecontroleerde manier zoals dat bij dieren mogelijk is.

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.

Kooiverrijking. De dieren krijgen in voedselbeloningen tijdens het uitvoeren van operante taken (Holeboard, set-shifting, 5-choice serial reaction time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak, habitueel operant zoekgedrag en schema-geïnduceerde polydipsie (SIP). Bovendien gebruiken de dieren vrijwillig alcohol.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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



Nee

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

De dieren kunnen niet met soortgenoten worden gehuisvest omdat we dan geen alcoholinname per rat kunnen bepalen.

#### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### Ongeriefinschatting/humane eindpunten

#### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voedselrestrctie, individuele huisvesting (voor verhoging motivatie sociaal spel, voor bepaling alcoholinname), voetschokken, eventueel ongerief tgv frustratie bij het niet krijgen van een beloning bij de gedragstaak.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Deze aantastingen zijn noodzakelijk voor het correct verlopen van het experiment.

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

Voedselrestrctie wordt tot een minimum beperkt. Perioperatieve zorg.

#### 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.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies (> 20% van het normale gewicht). Op basis van klinische verschijnselen (immobiliteit, verminderde reactie en piloerectie) worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.

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

Omdat er geen invasieve ingrepen nodig zijn voor deze experimenten verwachten we dat < 1% van de dieren kans loopt om de beschreven criteria voor het humane eindpunt te bereiken.

#### 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 dieren regelmatig geïnjecteerd (licht ongerief).
- Het grootste deel van het experiment zal bestaan uit operante conditioeringstaken waar geen ongerief aan ondervonden wordt.
- De milde voetschokken die de helft van de dieren krijgen voor geconditioneerde suppressie kunnen licht ongerief geven.
- Voedselrestrictie en individuele huisvesting die mogelijk worden toegepast geven licht ongerief.

Hoewel er op basis van voorgaande studies bij de gebruikte doseringen voor alcohol geen sprake is van zichtbare tekenen van ontweningsverschijnselen, kunnen we niet uitsluiten dat de dieren toch licht ongerief ondervinden door onttrekking.

Cumulatief classificeren we het ongerief op licht voor 60% van de dieren en matig voor 40% van de dieren (injecties, CS+ en voedselrestrictie)

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

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



Centrale Commissie Dierproeven i.o.

7.

## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10800
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universiteit Utrecht
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 2          | Gedragskarakterisatie en verslavingsgevoelighe d cocaine |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

## 2 Beschrijving dierproeven

### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimenten in dit project hebben tot doel om op te helderen wat het verband is tussen individuele emotionele en cognitieve gedragskenmerken, sociale context en de gevoeligheid voor verslavingsgedrag.

De overkoepelende hypothese is dat het risico op verslavingsgedrag wordt bepaald door emotionele en cognitieve gedragsaspecten, die met elkaar in verband staan. Zo verwachten we dat de gevoeligheid voor sociale beloning zal samenhangen met aandacht, impulscontrole en/of angstgedrag, factoren die allen bij kunnen dragen aan verslavingsgevoeligheid.

Om deze hypothese en onderliggende specifieke hypothesen te kunnen toetsen worden individuele dieren gekarakteriseerd op een of meerdere emotionele en/of cognitieve gedragskenmerken met behulp van verschillende gedragstaken.

- Sociaal spelgedrag: observatie van spel tussen 2 jonge ratten (21-42 dagen oud). De primaire uitkomstparameters zijn: pinning (tijdens sociale interactie rolt een dier met de rug tegen de grond en partner buigt eroverheen) en **pouncing** (met de neus de nek van de partner aanraken, 'uitdagend' gedrag voorafgaand aan **pinning**), gedragingen karakteristiek voor sociaal spelgedrag van jonge dieren.
- Gevoeligheid voor sociale beloning: met behulp van een operante taak wordt bepaald hoe veel moeite de ratten willen doen om toegang te krijgen tot een spelpartner. Deze methode is recent gevalideerd in ons lab. De primaire uitkomstparameter is hierbij: het **aantal actieve pedaaldrukken**, dat informatie geeft over de gevoeligheid van een rat voor de belonende effecten van spelgedrag alsmede de motivatie voor sociaal spelgedrag.
- Angst: observatie van gedrag in plus maze of open veld. De primaire uitkomstparameters zijn hierbij het **aantal entries** in en de **tijd** die de dieren doorbrengen in de veilige (gesloten, randen) en risicovolle gebieden (open, midden).
- Cognitief vermogen, impuls controle en aandacht:  
Holeboard, set-shifting, 5-choice serial react on time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak. Hierbij wordt gekeken naar twee primaire uitkomstparameters: het **aantal goede en foute keuzes en responsen** die de dieren maken (cognitie, aandacht) en naar het **aantal premature responsen** dat de dieren maken (impuls controle).
- Compulsiviteit:
  - a) habitueel operant zoekgedrag naar een aangename voedselbeloner zoals sucrose, chocolade of zoete gecondenseerde melk dat geïnduceerd wordt door een periode van vrije toegang tot deze voedselbeloner in de thuishooi, gevolgd door operante zelftoediening voor deze beloner met random-interval schema's. De mate van compulsiviteit wordt bepaald door de dieren voor een zelftoediening sessie te verzadigen door een voorafgaande periode van een tot enkele uren vrije toegang tot de voedselbeloner in de thuishooi. Hierbij zijn de **mate van responderen op de actieve pedaal danwel het zoeken naar een beloning** de primaire uitkomstparameters.
  - b) Schema-geïnduceerde polydipsie (SIP), waarbij ratten beperkt voedsel aangeboden krijgen volgens een bepaald schema terwijl ze water kunnen consumeren. De **overdreven consumptie van water** is de kritische parameter in deze test, dat als goed gevalideerd model voor OCD gebruikt wordt (zie bijv. d'Angelo et al, 2014, CNS Spectrums).

Na karakterisatie (of in sommige gevallen ervoor, afhankelijk van de vraagstelling, bijv. is een gedragskenmerk een risico op of gevolg van middelengebruik) van de dieren op een of meerdere van deze gedragskenmerken worden de dieren getest op verslavingsgevoeligheid voor cocaïne.

De combinatie van gedragstaken is afhankelijk van de specifieke vraagstelling. Enkele specifieke hypothesen die we hebben zijn:

De strategie die wij gebruiken om controle over cocaïne gebruik te bepalen is geconditioneerde suppressie, waarbij dieren worden getraind om te drukken voor cocaïne in operante kooien. Vervolgens wordt bepaald in welke mate een dier zijn zoekgedrag naar cocaïne aanpast als een waarschuwingssignaal, dat door angst conditioneerde, een footshock voorspelt, wordt gepresenteerd tijdens een zelftoedieningssessie. **Verlies van geconditioneerde suppressie**, dat bepaald wordt door vergelijking van geconditioneerde en niet-geconditioneerde dieren in dezelfde behandelgroep, wijst op controleverlies over ofwel compulsief cocaïne gebruik.

In een deel van de experimenten wordt gebruik gemaakt van psychofarmaca om ook de neurobiologische basis voor de verschillen in gevoeligheid voor cocaïne verslaving nader te onderzoeken. De psychofarmaca die gebruikt zullen worden zijn stoffen die invloed hebben op het beloningssysteem (dopamine receptor (ant)agonist, mu-opioïd receptor (ant)agonist, cannabinoid receptor (ant)agonist, dopamine heropname remmer, cannabinoïde afbraak remmer, N-acetyl-cysteïne), hunkering (N-acetyl-cysteïne, anti-epileptica zoals topiramaat), emotionele processen (GABA-A receptor (ant)agonist, GABA-B receptor (ant)agonist, benzodiazepines), cognitieve processen (AMPA receptor (ant)agonist, metabotrope glutamaat receptor (ant)agonist, noradrenaline receptor (ant)agonist, noradrenaline heropname remmer,) en compulsief gedrag (serotonine receptor (ant)agonist, serotonine heropname remmer) of zijn stoffen die nog als belangrijke targets voor het herstellen van controle over middelengebruik naar voren komen. De stoffen worden toegediend voor de geconditioneerde suppressietest (voor bepaling van compulsief cocaïne gebruik), in een within-subjects design wat betekent dat de dieren hun eigen controle zijn en dat er voor de farmacologische behandeling geen extra dieren nodig 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.

- Scoren van sociaal spelgedrag: observatie van spel tussen 2 jonge ratten (21-42 dagen oud) in 15 minuten durende sessies na een isolatieperiode van 2-24 uur. Twee metingen per dier.
- Korte gedragstesten: plus maze of open veld (eenmalige testen, max. 30 minuten per test)
- Holeboard test: 20-30 trials per dier, max. 5 minuten per trial.
- Voedselrestrictie: 85-90% van het vrijvoer gewicht om de dieren gemotiveerd te maken voor de operante taak; dagelijks maar zodanig dat het lichaamsgewicht niet meer dan 10% daalt ten opzichte van de groeicurve.
- Uitvoeren operante taak (sociale beloning, set-shifting, 5-choice serial reaction time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak of compulsiviteit): dagelijks 16 weken
- Sociale isolatie – kortdurend (2-24 uur) voorafgaand aan de spelexperimenten en langdurig (weken) voor cocaïne zelftoediening (om schade aan de vena jugularis cannules te voorkomen)
- Vena jugularis cannulaties onder injectie anesthesie
- Operante zelftoediening voor cocaïne (max. 20 weken)
- Trainen van de dieren voor geconditioneerde suppressie: toon associaties met milde voetschokken (0.3-0.5 mA, gemiddeld 1 per minuut in 10 minuten durende sessies; max. 4 sessies per dier, bij de helft van de dieren). Milde voetschokken geven kortdurend licht ongerief.
- Geconditioneerde suppressie test: cocaïne zelftoediening met/ zonder toon (4-12 sessies per dier)
- Systemische injectie van psychofarmaca (intraperitoneaal of subcutaan, max. 15 per dier met minimaal 24 uur tussen twee injecties. Aantal injecties en

toedieningsweg is afhankelijk van de stof)

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

Bij het bepalen van het aantal dieren gaan we uit van eerdere resultaten uit onze eigen onderzoeksgroep, waarin een grote mate van natuurlijke individuele variatie in alcoholinname, spelgedrag en cognitief vermogen is aangetoond in Lister Hooded ratten.

De belangrijkste parameter in deze experimenten is steeds de mate van controle over cocaïne-zoekgedrag, die blijkt uit de mate van geconditioneerde suppressie in het aantal responsen die de dieren maken voor cocaïne. Met een verwacht verschil van 4.6 responsen en een standaard deviatie van 4.2 is een groepsgrootte van 14 ratten nodig om de kans op vals negatieve resultaten tot minder dan 20% te reduceren (power van 80% en een alpha van 0.05). Deze berekening is gemaakt met behulp van de online power calculator (<http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/n2.html>).

Omdat we juist geïnteresseerd zijn in de extremen, selecteren we per populatie de uiterste kwartielen op basis van gedragskenmerken of middelen gebruik, afhankelijk van de vraagstelling. Daarnaast is voor de geconditioneerde suppressie een niet-geconditioneerde controlegroep (CS-) nodig. Dit maakt dat voor ieder experiment in totaal  $14 * 2$  (CS- en CS+)  $* 4$  (kwartielen) =  $\sim 112$  dieren nodig zijn.

Om de relatie tussen de genoemde individuele gedragskenmerken (7 operante taken) met verslavingsgevoeligheid te onderzoeken zijn  $7 * 112 = 784$  nodig. Hierbij is rekening gehouden met de mogelijkheid om in sommige gevallen verschillende gedragingen te kunnen bepalen in 1 dier, zoals sociaal spelgedrag en angstgedrag. Dit is afhankelijk van de vraagstelling (zie voorbeeld hypothesen in 2A) en van de gedragstaak. Zo is het bijvoorbeeld niet mogelijk om dezelfde dieren te testen in een 5-choice serial reaction time taak en in een delayed reward taak omdat deze testen elkaar kunnen beïnvloeden. Wij vragen nog 10% extra dieren aan, op basis van ervaring, voor de bepaling van optimale doseringen van farmaca, pilots voor eventuele aanpassingen gedragstaken en onverwacht uitval van dieren. In totaal zullen wij voor deze studie daarom  $784 + 78 = 862$  ratten nodig hebben.

## **B. De dieren**

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

862 ratten, man, Lister Hooded.

Er bestaan uitstekende modellen met ratten om verslavingsgedrag te bestuderen. Wij hebben uitgebreide ervaring met het bestuderen van verslavingsgedrag bij ratten. De Lister Hooded populatie vertoont veel biologische variatie in gedrag, o.a. impulsiviteit en sociaal gedrag en verslavingsgedrag, die noodzakelijk is voor een aantal van onze wetenschappelijke benaderingen waarbij individuele variatie een rol speelt.

De goede cognitieve capaciteit van de Lister Hooded rat maakt deze rattenstam tevens zeer geschikt voor onze impulsiviteitstaken, waardoor de trainingsduur voor de taken korter is. Aangezien voorgaande studies gebaseerd zijn op resultaten met de Lister Hooded rattenstam, willen we het vervolgonderzoek hiermee voortzetten.

Wij kiezen bewust om in deze fase van ons onderzoek alleen mannen te gebruiken. De prevalentie van verslaving is veel groter in mannen dan in vrouwen; alcoholverslaving komt bijvoorbeeld ongeveer twee keer zo vaak voor bij mannen dan bij vrouwen (bijv. Nationale Drugs Monitor 2011, Trimbos Instituut). Deze sekse verschillen zouden dit onderzoek in deze fase – dat als primaire doel heeft om te bepalen wat de mechanismen zijn die bijdragen aan alcoholinname en alcoholverslaving – nadelig beïnvloeden. Ten derde is onze keuze ook methodologisch – de modellen voor verslaving die in de afgelopen

periode ontwikkeld zijn en mede de basis vormen voor dit onderzoek zijn uitgevoerd in mannen. Indien we voor vrouwen zouden kiezen zou al dit voorwerk ook opnieuw uitgevoerd moeten worden, hetgeen in ieder geval in deze fase van de studie voorbij gaat aan het primaire doel van dit onderzoek. Afhankelijk van de uitkomsten van ons onderzoek zullen wij in de toekomst overwegen om ook naar vrouwen te kijken, maar de relatieve relevantie van onderzoek bij mannen is momenteel nog zo hoog dat we daar vooralsnog niet voor kiezen.

De dieren zullen allemaal jong binnenkomen (3 weken oud) om ze op spelgedrag, dat zich manifesteert in de 4e en 5e week van de rat, te kunnen karakteriseren.

#### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vermindering:

- In het kader van vermindering is het niet mogelijk om surplusdieren te gebruiken. Voor de gedragstaken in dit onderzoek is het van belang dat de dieren experimenteel naïef zijn, dus niet eerder zijn getest of blootgesteld aan farmaca. Bovendien worden voor deze experimenten de dieren op spelgedrag gekarakteriseerd, op de leeftijd van 4-5 weken, hetgeen gebruik van surplus dieren bemoeilijkt.
- Er is zoveel mogelijk gekozen voor outbred (ratten) stammen omdat we juist geïnteresseerd zijn in de natuurlijke mate van individuele verschillen tussen dieren in verslavingsgevoeligheid in relatie tot individuele gedragskenmerken die voorspellend kunnen zijn voor verslavingsgevoeligheid. We kiezen er bewust niet voor om geselecteerde ratten stammen te vergelijken omdat deze geselecteerd zijn en daardoor een bias in zich hebben en niet meer een compleet beeld geven van verschillende gedragsaspecten die het risico op verslaving bepalen, zoals we dat bij de mens zien.
- We gebruiken uitsluitend mannelijke dieren omdat verslaving vooral voorkomt bij mannen, het bekend is dat mannen en vrouwen verschillen in alcoholinname en omdat onze en andere eerdere resultaten allemaal verkregen uit mannelijke dieren, en in het kader van replicatie is het daarom van belang om nu ook weer mannen te gebruiken.
- Voor de farmacologische experimenten wordt gebruik gemaakt van een within-subjects design, waardoor elk dier als zijn eigen controle kan dienen. Dit is mogelijk omdat herhaaldelijk uitvoeren van geconditioneerde suppressietesten in voorgaand onderzoek betrouwbare resultaten heeft gegeven.
- We doen veelal meerdere gedragstesten in 1 dier, waardoor we minder dieren nodig hebben en bovendien een rijkere dataset krijgen en meer te weten komen over de inter-relatie tussen gedragskenmerken in de gevoeligheid voor verslaving.

#### Verfijning:

- Vanwege de aard van onze experimenten worden de dieren veelal dagelijks zeer intensief gecontroleerd door onderzoekers waar de dieren aan gewend zijn. Daardoor kunnen wij de verzorging en eventuele pijnstilling goed op de dieren afstemmen.
- Warmtematjes tijdens en na operatie
- Fysiologisch zout na operatie

#### Vervanging:

- Omdat we kijken naar gedrag, zijn er geen alternatieve (in vivo) methoden.
- Humaan onderzoek kan het hier beschreven onderzoek niet vervangen om verschillende redenen. Het is bijvoorbeeld bij mensen vaak niet mogelijk om het gebruik van een verslavend middel te onderzoeken zonder dat ook nog een ander verslavend middel (zoals nicotine, heroïne, amfetamine, ...) gebruik wordt. Bovendien bepalen externe factoren, zoals cultuur, omgevingsfactoren etc. vaak het gedrag van mensen zonder dat dit te achterhalen is. Daarnaast is het niet mogelijk om met behulp van farmaca gedrag te beïnvloeden op een gecontroleerde manier zoals dat bij dieren mogelijk is.

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.

Per operatieve zorg en pijnbestrijding, kooiverrijking. De dieren krijgen in voedselbeloningen tijdens het uitvoeren van operante taken (Holeboard, set-shifting, 5-choice serial reaction time taak, rat gambling taak, delayed reward taak, attentional bias taak, habitueel operant zoekgedrag en schema-geïnduceerde polydipsie (SIP). Bovendien gebruiken de dieren vrijwillig cocaïne.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren kunnen niet met soortgenoten worden gehuisvest omdat de ratten elkaars vena jugularis cannules kunnen beschadigen.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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



Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### Ongeriefinschatting/humane eindpunten

#### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voedselrestrctie, individuele huisvesting (voor verhoging motivatie sociaal spel, voor bescherming van vena jugularis cannule), voetschokken, operatie, eventueel ongerief tgv frustratie bij het niet krijgen van een beloning bij de gedragstaak.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Deze aantastingen zijn noodzakelijk voor het correct verlopen van het experiment.

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

Voedselrestrctie wordt tot een minimum beperkt. Perioperatieve zorg.

#### 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.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies (> 20% van het normale gewicht). Op basis van klinische verschijnselen (immobiliteit, verminderde reactie en piloerectie) worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.

- Motorische tval of lethargie na operatie.

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

Maximaal 2% loopt na operatie de kans de beschreven criteria voor het humane eindpunt te bereiken.

#### K. Classificatie van ongerief

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

- Het meeste ongerief zullen de dieren ondervinden van de operatie, welke maximaal 1 keer zal plaatsvinden (matig ongerief).
- Daarnaast worden de dieren regelmatig geïnjecteerd (licht ongerief).
- Het grootste deel van het experiment zal bestaan uit operante condit oneringstaken waar geen ongerief aan ondervonden wordt.
- De milde voetschokken die de helft van de dieren krijgen voor gecond tioneerde suppressie kunnen licht ongerief geven.
- Voedselrestrictie en individuele huisvesting die mogelijk worden toegepast geven licht ongerief.

Hoewel er op basis van voorgaande studies bij de gebruikte doseringen voor cocaïne geen sprake is van zichtbare tekenen van ontwenningverschijnselen, kunnen we niet uitsluiten dat de dieren toch licht ongerief ondervinden door onttrekking.

Cumulatief classificeren we het ongerief voor deze experimenten op matig (operatie, injecties, voetschokken en voedselrestrictie).

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002015189  
**Bijlagen**  
2

Datum 27-07-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 juli 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015189. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### Gegevens aanvrager

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30275924  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 augustus 2015  
Geplande einddatum: 31 juli 2020  
Titel project: Individuele verschillen in beloning en cognitie  
Titel niet-technische samenvatting: Individuele verschillen in verslavingsgevoeligheid  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utecht

Datum:

22 juli 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht  
t.a.v. [REDACTED]  
Instantie voor Dierenwelzijn  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht  
Nederland

**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  
AVD108002015189

**Uw referentie**

Datum 20 augustus 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
2

Geachte heer/mevrouw,

Op 22 juli 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project: Individuele verschillen in beloning en cognitie met aanvraagnummer AVD108002015189 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). U kunt met uw project; Individuele verschillen in beloning en cognitie starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020. De startdatum is anders dan uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 juli 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige



voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.


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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020, voor het project Individuele verschillen in beloning en cognitie starten met aanvraagnummer AVD108002015189, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 27 juli 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 juli 2015.
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 24 juli 2015.
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 24 juli 2015

### Dierproeven

| Naam dierproef   | Diersoort         | Aantal dieren | Ernst                  |  |
|--|-------------------|---------------|------------------------|--|
| Gedrag karakterisatie en verslavingsgevoeligheid alcohol | Lister hooded rat | 1355          | Licht 60%<br>Matig 40% |  |
| Gedrag karakterisatie en verslavingsgevoeligheid cocaïne | Lister hooded rat | 862           | matig                  |  |

### Voorwaarden

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

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

| Inventaris Wob-verzoek W16-04s |                                      |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|--------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                                      | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                             | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS 20151201</b>                  |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier                    |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 2                              | Niet-technische samenvatting (oud)   |                 |      |        | X     |                   |        |        |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting (nieuw) | X               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 4                              | Bijlage beschrijving dierproeven 1   |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 5                              | Bijlage)beschrijving dierproeven 2   |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 6                              | Power analyse                        |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 7                              | Projectvoorstel                      |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 8                              | Behandelingsschema                   |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 9                              | Tabel ongerief                       |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 10                             | DEC-advies                           |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 11                             | melding / machtiging                 |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |
| 12                             | Ontvangstbevestiging                 |                 |      |        |       |                   | X      |        |      |
| 13                             | Advies aan bestuur                   |                 | X    |        |       |                   |        |        | X    |
| 14                             | Beschikking en vergunning            |                 |      |        |       |                   | X      | X      |      |

06 AUG 2015

1.



Centrale Commissie Dierproeven

06 AUG 2015

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

|     |   |  |   |
|-----|---|--|---|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11400<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen |   |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie   | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC) Amsterdam                   |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde  | [Redacted]  |
|     |   | KvK-nummer   | 53815211  |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | de Boelelaan   1117   |
|     |   | Postbus  |   |
|     |   | Postcode en plaats   | 1081HV   Amsterdam  |
|     |   | IBAN   | [Redacted]  |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer  | [Redacted]  |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [Redacted]  |
|     |   | Afdeling   | [Redacted]  |
|     |   | Telefoonnummer   | [Redacted]  |
|     |   | E-mailadres  | [Redacted]  |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [Redacted]  |
|     |   | Afdeling   | [Redacted]  |
|     |   | Telefoonnummer   | [Redacted]  |
|     |   | E-mailadres  | [Redacted]  |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum | 1 - 9 - 2015
- Einddatum | 31 - 8 - 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC | DEC-VU-VUMC
- Postadres | Van der Boechorststraat 1, [REDACTED]  
1081 BT Amsterdam | The Netherlands
- E-mailadres | [REDACTED]



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

### 1 Algemene gegevens

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project    | <b>Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)</b> |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar  |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Gehumaniseerd muizenmodel, hematologische tumoren (van patiënten), biobank van geëxpandeerde patiëntenmateriaal                     |

### 2 Categorie van het project

|  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.     | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Translatieel of toegepast onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

### 3 Projectbeschrijving

|   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <b>Achtergrond/wetenschappelijke vraagstelling</b><br>Bij de behandeling van beenmergkanker, zoals acute leukemie en multipel myeloom blijkt het percentage genezen patiënten nauwelijks toe te nemen en schommelt dit al vele jaren rond 50% bij leukemie en rond 10% bij multipel myeloom. Hoewel patiënten in eerste instantie goed reageren op therapie, blijkt er vaak een klein restant aan tumorcellen te zijn dat de behandeling heeft overleefd en waarvan uit de ziekte weer kan terugkeren. Deze tumorcellen blijken veelal ongevoelig (resistent) te zijn geworden voor therapie. De oorzaak hiervoor kan liggen in veranderde genetische kenmerken van de tumorcellen. Soms waren deze veranderingen al vanaf het begin aanwezig in een klein aantal tumorcellen, soms ontstaan deze tijdens en vaak dóór de |
|---|---|



therapie. In dit project maken wij gebruik van een eerder door ons ontwikkelde methode waarbij we in muizen, onder de huid, tumorcellen die van de patiënten zelf afkomstig zijn, kunnen laten uitgroeien. Daarbij hebben we geconstateerd dat de tumorcellen hun kenmerkende groei-eigenschappen én het patroon van gevoeligheid of resistentie voor therapie, behouden.

Voor dit doel gebruiken we muizen met een verzwakt immuunsysteem. Het is echter wel essentieel om eerst een drager (█ genoemd) die met stamcellen is bezaait, onder de huid (subcutaan) te implanteren. Dit groeit in een aantal weken uit tot een knobbeltje weefsel met daarin bot/beenmergachtige structuren van humane origine. Wanneer hierin vervolgens van patiënten afkomstige tumorcellen in geïnjecteerd worden, fungeert dit als een voedingsbodem voor de tumorcellen en kunnen de cellen uitgroeien tot tumoren.

De doelstelling van dit project is om beenmerg of bloedmonsters van de leukemie of myeloompatiënten (die afgenomen worden ofwel vóór therapie (bij diagnose) en ná chemotherapie (als de ziekte terugkeert) in muizen te laten uitgroeien tot tumoren. Na euthanasie van de muizen worden de tumoren verwijderd en uitgebreid geanalyseerd en gekarakteriseerd. Tevens worden de tumorcellen ingevroren ten behoeve van het aanleggen van een zogenaamde biobank van hematologische tumoren.

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

**Wetenschappelijk belang:**

De bij de patiënten afgenomen beenmerg-/bloedmonsters leveren lang niet altijd voldoende tumorcellen op voor aanvullend onderzoek en wanneer de behandeling eenmaal is gestart, zijn er bij de patiënten geen "oorspronkelijke" cellen van het "diagnose-stadium" meer aanwezig. Middels de biobank krijgen we de beschikking over een grote hoeveelheid oorspronkelijk (patiënten) tumor materiaal van de verschillende typen leukemie en multipel myeloom (en verschillende stadia van de ziekte), zónder dat we daarvoor opnieuw tumorcellen bij muizen hoeven te laten uitgroeien. Deze biobank fungeert als bron van volledig gekarakteriseerde patiënten tumorcellen waarmee selectief, specifieke in vitro en in vivo experimenten uitgevoerd kunnen worden. In een ander onderdeel van het onderzoeksprogramma worden deze tumorcellen weer gebruikt voor onderzoek dat gericht is op therapie-ontwikkeling. Zodoende draagt dit project bij aan het verkrijgen van een verbeterd inzicht in de specifieke (genetische) kenmerken van therapie-resistente hematologische tumoren, (dus de "zwakke plekken in de verdediging" van de tumorcellen). Hierdoor wordt duidelijk waarop nieuwe immuno-chemotherapie bij patiënten met deze specifieke kenmerken, moet worden afgestemd.

**Maatschappelijk belang:**

Van de circa 1200 personen per jaar in Nederland, die een beenmergkanker ontwikkelen, geneest minder dan de helft. De reden is veelal therapieresistentie. Dit project vormt het startpunt voor aanvullende studies die op hun beurt een belangrijke bijdragen kunnen gaan leveren aan het verkrijgen van betere behandelingsmogelijkheden, door het ontwikkelen en uittesten van nieuwe chemotherapie met of zonder immuuntherapie. Deze behandelingen worden in het hier beschreven █ de preklinische fase op hun effectiviteit getest, met het doel deze ook klinisch en op de tumorspecifieke kenmerken ("de zwakke plekken") te gaan toepassen bij leukemie- en myeloompatiënten.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Er wordt alleen met muizen gewerkt. Tijdens de looptijd van het project van 5 jaar worden in totaal 2100 muizen gebruikt.

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

Bij de muizen die voor dit project worden gebruikt zullen er subcutaan tumoren gaan groeien. Deze ontstaan vanuit subcutaan geïnjecteerde tumorcellen die afkomstig zijn van leukemie - of myeloom patiënten. De groei van tumoren wordt gevolgd m.b.v. schuifmaat metingen. Vóórdat er ongerief optreedt wordt het experiment beëindigd door middel van euthanasie.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

Ongerief: matig

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Aan het eind van het experiment worden de dieren op humane wijze gedood, teneinde weefsels voor verder onderzoek te kunnen verkrijgen.



## 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.

Vanwege de eerder gebleken onmogelijkheid om leukemie/myeloom patiënten-materiaal met behoud van specifieke kenmerken, *in vitro* te laten uitgroeien, is het ook niet mogelijk om *in vitro* de specifieke (groei-)eigenschappen van de tumorcellen van patiënten te bestuderen en, in een latere fase van het onderzoek, ook niet om *in vitro* nieuwe chemo-immuno-combinatie therapieën uit te testen.

### 4.2 **Vermindering**

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

In het voorafgaande onderzoek is gebleken dat het mogelijk is om met 3 muizen per patiëntmonster voldoende materiaal te verkrijgen voor verder onderzoek én voor opslag in de diepvries biobank voor toekomstige experimenten.

### 4.3 **Verfijning**

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

We hebben gekozen voor muizen met een verzwakt immuunsysteem omdat hierin tumorcellen van patiënten kunnen uitgroeien. Daarvoor is het wel essentieel dat we eerst subcutaan bij deze muizen "humane beenmergachtige structuren" laten uitgroeien. In het "model" dat in voorafgaand onderzoek door ons is ontwikkeld blijft de groei van de tumorcellen veelal beperkt tot de subcutane locatie waarin de tumorcellen zijn geïnjecteerd. Wij zien weinig uitgroei van tumorcellen in muizenorganen (bijv. lever, milt, beenmerg) waardoor er, ten opzichte van andere leukemiemodellen, minder ongerief optreedt.

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

Wij werken volgens de code-of-practice kankeronderzoek. Waar mogelijk worden handelingen uitgevoerd onder narcose; indien mogelijk, wordt een antagonist toegediend; postoperatieve pijnbestrijding wordt toegepast; meting en registratie van de grootte van de tumoren wordt gebruikt om het humane eindpunt tijdig te kunnen vaststellen; indien relevant wordt het lichaamsgewicht gebruikt om een eventueel HEP te kunnen bepalen; aan het eind van het experiment worden de dieren gedood volgens de richtlijn 2010/63/EU.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 11400  |            |                |   |  |
|---|--|------------|----------------|---|--|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam.  |            |                |   |  |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED] |
| Volgnummer  | Type dierproef   |            |                |   |  |
| 1   | Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]   |            |                |   |  |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het hier beschreven type dierproef wordt in het onderzoeksproject voor de volgende doeleinden gebruikt:  
Ten eerste voor het laten uitgroeien van primaire tumorcellen afkomstig uit bloed of beenmergmonsters van patiënten met verschillende vormen van hematologische maligniteiten (o.a. leukemie en myeloom) [REDACTED] in muizen;  
Ten tweede, voor onderzoek naar de veranderingen die optreden in de "[REDACTED]" van deze patiënten (daar waar de tumorcellen zich in het beenmerg bevinden), met betrekking tot botvormende capaciteit van stromale cellen in de niche.  
Ten derde, onderzoek naar de (genetische en functionele) veranderingen die er optreden in stromale cellen als gevolg van specifieke interacties tussen (normale) stromale cellen en de hematologische tumorcellen of als gevolg van interacties tussen maligne stromale cellen met normale hematopoietische stamcellen (HSC).

Voor alle drie deze doelstellingen wordt nagenoeg dezelfde (dier-)proefopzet gebruikt. Dit betreft de methode om bij muizen, een bot-stroma-beenmergachtige structuur **van humane origine** te laten uitgroeien. [REDACTED] genoemd is uniek vanwege het feit dat wanneer primair materiaal van hematologische tumoren (d.w.z. direct van patiënten afkomstig) hierin geïnjecteerd wordt, dat de gecreëerde humane omgeving de uitgroei van deze primaire tumorcellen ondersteunt. Dit blijkt het geval voor zowel acute myeloïde leukemie (AML), multipel myeloom (ziekte van Kahler), myelodysplastisch syndroom (MDS), myelofibrose (MF), en voor naar het beenmerg metastaserende lymfomen en/of solide tumoren (borst-prostaat kanker). Verder leent het [REDACTED] zich uitstekend om veranderingen die er optreden in de stromale cellen te onderzoeken die verantwoordelijk zijn voor het in stand houden van de bot/beenmerg/stroma omgeving in de "niche".

**A1. De keuze voor dit model voor het karakteriseren van primaire hematologische tumoren is gebaseerd op de volgende argumenten:**

- 1 Voor het translationeel hematologische onderzoek is het van groot belang om experimenten te kunnen verrichten met primair patiënten materiaal, waardoor de resultaten direct terug gekoppeld kunnen worden naar de **individuele** patiënt en zijn therapie; resultaten van het onderzoek hebben meer relevantie wanneer er primair materiaal is getest dan wanneer er cellijnen worden gebruikt. (Desalniettemin worden er voor specifieke experimentele vraagstellingen ook wel met cellijnen in dit project gewerkt).
- 2 M.b.v. het [REDACTED] is het mogelijk om de vaak kleine monsters (met weinig celopbrengst) die bij patiënten afgenomen (kunnen) worden enorm te expanderen ten behoeve van aanvullend onderzoek en voor opslag in de tumor biobank, die bedoeld is voor toekomstig en retrospectief onderzoek (dat geldt voor zowel diagnose monsters maar ook remissie en relapse monsters).
- 3 Heel belangrijk is het feit dat de tumorcellen van patiënten in hun oorspronkelijke en natuurlijke omgeving kunnen groeien en uit eerder onderzoek van ons is gebleken dat de eigenschappen van groei, en ook het patroon van chemo-gevoeligheid maar ook van chemo-resistentie daarin behouden blijft.
- 4 Door de tumorcellen genetisch te markeren met merker genen zoals bijvoorbeeld genen die coderen voor het luciferase gen of fluorescerende eiwitten kan, indien gewenst, de groei met imaging technieken (kwantitatief) worden gemonitord.

**Primaire uitkomstparameters (A1)**

- 1 na het injecteren van de tumorcellen in de [REDACTED] is de belangrijkste parameter: "tumor groei ja of nee"
- 2 vervolgens worden de groeiende tumor gemeten m.b.v. een schuifmaat: niet alleen om groeisnelheid te bepalen (i), maar mede om op basis van tumorvolume het moment van bereiken van het humane eindpunt te kunnen bepalen en het experiment te kunnen stoppen (ii) en voor het vullen van een biobank (iii).
- 3 uitgebreide analyse van de tumoren, genetisch (whole exome sequencing), met FACS, immuno-histochemie van de tumor in situ, eventueel met CyTOF analyse. Tevens wordt het stroma van de [REDACTED] opgekweekt om te analyseren wat het hebben van interactie met tumorcellen aan genexpressie veranderingen heeft teweeg gebracht. Daarnaast wordt onderzocht wat het gevolg is voor normale hematopoietische stamcellen als deze contact hebben met maligne stroma. Al deze analyses zijn reeds door onze beproefde methoden die routinematig worden uitgevoerd.

**A2. De keuze voor dit model voor het onderzoek aan (a) botmetabolisme en (b) stromafunctie in de [REDACTED] is gebaseerd op het volgende:**

Het [REDACTED] leent zich bij uitstek voor bot metabolisme (vorming alsmede afbraak) studies en met het type dierproef waar we in dit kader gebruik van maken, kunnen we het proces van osteolyse en osteogenese bij de groei van tumoren volgen. Osteolyse is een van de grote problemen bij multipel myeloom, en middelen om dit te voorkomen zijn zeer gewenst. Ook na effectieve therapie wordt er, hoewel er osteoblasten aanwezig zijn, geen herstel van de botvorming gezien. Door analyse van het MM stroma in het [REDACTED] proberen we daar de oorzaak van te achterhalen en door genetische manipulatie van normale stromale cellen deze verstoorde functie in het [REDACTED] te reproduceren om vervolgens agentia/medicatie toe te dienen die botvorming weer zou kunnen aanzetten.

Ad A2a. De parameter/assay voor het bestuderen van **botvorming** is op zich vrij eenvoudig; stromale cellen vanuit verschillende bronnen (zoals MM beenmerg, of genetisch gemodificeerde normale stromale cellen (om het maligne stroma te simuleren), worden [REDACTED]

[REDACTED] (soms met tussentijdse medicatie om genexpressie te beïnvloeden) met als **belangrijkste parameter: botvorming/bot afbraak.**

Ad A2b. Voor het onderzoek aan het **stroma** van de [REDACTED] worden stromale cellen geïsoleerd en uitgezaaid op de [REDACTED] en in het [REDACTED] getest.

1. daarbij wordt onderzocht welke functionele veranderingen in de stromale cellen ontstaan als deze in contact komen met multipel myeloom of leukemie tumorcellen, met als doel genen te identificeren die de verstoorde botvorming en verstoorde hematopoiese kunnen verklaren en daardoor een target voor therapie zijn.
2. om de rol van specifieke genen in deze processen te bestuderen worden genen in stromale cellen uitgeschakeld of tot over-expressie gebracht en het effect daarvan op de groei van de tumorcellen (MM en AML), in het [REDACTED] onderzocht.
3. Bij myelodysplastische syndroom (MDS) is één van de vragen of er vanuit stromale cellen uit MDS beenmerg een maligniteit (leukemie/sarcoom) kan ontstaan? Of ontstaat die uit, door MDS stroma-geïnduceerde transformatie uit (wat wij gaan onderzoeken geïnjecteerde) normale HSC 's, een leukemie? En welke gen veranderingen, waarmee we dit kunnen verklaren, liggen daar dan aan ten grondslag?
4. Bij myelofibrose (MF) patiënten zijn de vragen: -groeien de stromale cellen van MF patiënten BM uit naar fibrotische niche i.p.v. van naar een normale bot/niche? Treedt er een verandering op in genexpressie van geïnjecteerde (normale) (HSC) bij contact met dit MF stroma?. Transformeren MF-HSC normaal stroma zodat dit pathologisch weefsel wordt? Of transformeert MF stroma normale stamcellen naar leukemie stamcellen.

Voor beide ziektebeelden zijn de **belangrijkste vragen/parameters.**

**- ontstaat er leukemie? ontwikkelt zich een tumor? welke gen-veranderingen liggen ten grondslag aan de pathogenese van deze ziekten?**

**Primaire uitkomstparameters (A2)**

- 1 is er tumor uitgroei ja of nee (bij experimenten met "interactie" tussen normaal stroma en maligne cellen of maligne stroma met normale cellen)
- 2 als tweede parameter meting van subcutane tumoren met schuifmaat (om groeisnelheid te bepalen) ter voorkómen van het bereiken van het humane eindpunt.

- als laboratorium parameters, worden de tumoren uitgebreid geanalyseerd, genetisch (whole exome sequencing, WES, gen expressie profilering (GEP), met FACS, immuno-histochemie van de tumor in situ, eventueel met CyTOF analyse van cel suspensies. Tevens zal het stroma van de [REDACTED] worden opgekweekt om te analyseren wat het hebben van interactie met tumorcellen aan genexpressie voor veranderingen heeft teweeg gebracht. Al deze analyses zijn reeds eerder door ons beproefde en toegepast en deze kunnen intussen routinematig worden uitgevoerd.
- voor specifieke experimenten kunnen de cellen met merkgenen worden gemarkeerd (luciferase/GFP of bijvoorbeeld mCherry) en de uitgroei van de gemarkeerde cellen kan dan met bioluminescentie/fluorescentie gevolgd worden; het experiment kan dan gestopt worden op basis van een maximaal signaal (dat gecorreleerd is aan tumorgroei). Dit gebeurt niet standaard omdat we in de regel de uitgroei van "ongestoorde" tumorcellen willen kunnen bestuderen. Het valt niet uit te sluiten dat genetische markering leidt tot selectie. Soms is dat wel acceptabel, soms ook niet; dit hangt af van het beoogde doel van het betreffende experiment.

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.

#### Fase I

1

#### Fase II Injectie met tumorcellen (of normale hematopietische stamcellen in [REDACTED])

- één dag voor injectie met cellen krijgen de dieren een lage dosis totale lichaamsbestraling (1.5Gy X-ray equivalent); dit bevordert een tumor-take in sterke mate.
- onder narcose krijgen de dieren of (i) een transcutane injectie van tumorcellen/ stamcellen; (ii) of ten behoeve van specifieke homings experimenten, een intra cardiale injectie van tumorcellen/stamcellen, of, niet onder narcose maar gefixeerd in een constrainer, een intraveneuze injectie. (nb bij intra cardiale injectie wordt voorkomen dat een groot gedeelte van de tumorcellen al direct in het vaatbed van de longen wordt weggevangen waardoor een specifiek homingsgedrag negatief zou worden beïnvloed.
- de dieren worden geobserveerd voor tumor uitgroei; onze ervaring is dat dit van 4 tot 12 maanden kan duren want, evenals bij patiënten, groeien deze tumoren lang niet altijd snel, zeker niet in aanvang.
- bloedafname: 1x per maand; in eindfase 2 x per maand (enkele druppels, veel minder dan 10% van bloedvolume)
- visuele inspectie voor tumorgroei, elke twee weken, bij tekenen van groei, starten met schuifmaatmeting van de tumoren en het wegen van de dieren.
- voor sommige experimenten waarin de uitgroei van luciferase-gemarkeerde tumorcellen gevolgd moet worden (met name bij de experimenten waarin de stromale cellen in de niche genetisch zijn gemanipuleerd) ondergaan de dieren een bioluminescentie imaging (1x per maand, in eindfase maximaal 1 x per week), die onder isofluraan narcose wordt uitgevoerd in de Phi-imager<sup>®</sup> van Biospace. Hierin verblijven de dieren kort ( $\pm$  15 minuten) waar ze op een verwarmde tafel gemonitord worden ten behoeve van het maken van een BLI opname (om tumorgroei/afname kwantitatief te kunnen bepalen), nadat ze een injectie met luciferine (substraat voor luciferase) i.p. toegediend hebben gekregen.

n.b.:

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

Een belangrijke overweging bij het inschatten van het aantal dieren dat voor dit onderdeel van het project nodig is, is het gegeven dat van elk van de hoofdtypen hematologische tumoren (te weten AL, MM en MDS en MF) er op grond van overeenkomstige FAB classificatie, (die overigens meer en meer vervangen wordt door genetische classificering) genetisch afwijkende patronen of van FACS-immunofenotype, er verscheidene subgroepen onderscheiden kunnen worden. Om een goed overzicht te krijgen van de karakteristieken van elk van de patiëntengroepen en om een goede representatie van elk van de subtypen in de biobank te krijgen, moeten er per subtype een groot aantal patiënten worden onderzocht. In totaal komen per jaar, alleen al in Nederland, circa 1000 nieuwe patiënten bij (over alle typen hematologische tumoren bij elkaar). Ons streven is om daarvan per jaar gemiddeld 50 patiënten monsters te testen op uitgroei, verdeeld over acute leukemie (AL), multiple myeloom (MM), en de myeloproliferatieve neoplasie (MDS en MF) en de verkregen tumorcellen daarvan aan onze biobank toe te voegen. Onze ervaring is dat de kans dat de tumorcellen van patiënten in het [REDACTED] uitgroeien, is voor AL heel groot (>95%), voor MM iets minder  $\pm$ 60-70 %; voor MDS > 50% en voor MF hebben we nog niet voldoende ervaring. Per muis kunnen er maximaal 6 tumoren uitgroeien, maar dat aantal wordt niet altijd gehaald; de uitgroei kan lang duren (tot soms wel 12 maanden) en in de wetenschap dat we onderweg nauwelijks dieren verliezen komen we op een aantal van 3 dieren per patiënt. Ook wanneer er dieren worden gevolgd met bioluminescentie imaging is het aantal van 3 dieren ([REDACTED], niet geheel onafhankelijk uiteraard) een goed aantal gebleken om met statistische voldoende significantie en power, experimenten te kunnen evalueren.

## B. De dieren

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

- Diersoort: muizen, volwassen (vanaf leeftijd 8-9 weken)  
Sekse: vrouwelijke dieren. De reden dat alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden bij deze experimenten is omdat in het verleden, bij herhaling, is gebleken dat mannelijke dieren na de operatie solitair gehuisvest moesten worden (om de huidwond/hechting te laten herstellen) en als ze meteen of later bij elkaar worden gezet resulteert dit direct ernstige onderlinge gevechten. In het verleden leidde dit óf al in de eerste fase van het experiment óf op een later moment in het experiment tot uitval. Daarbij geeft (langdurige) solitaire huisvesting langdurig ongerief. Dit alles is te vermijden door alleen vrouwelijke dieren voor deze experimenten te gebruiken. Bij het type experimenten dat wij uitvoeren is nooit gebleken dat de sekse van de dieren invloed heeft op de resultaten van het onderzoek. Wij realiseren ons dat dit bij de fok een overschot aan mannelijke dieren oplevert. Deze worden bij de speendatum afgevoerd; er wordt echter wel met een gericht oog gekeken naar mogelijkheden om de mannelijke dieren voor andere studies te gebruiken.
- Stam: RAG2GC-KO
- Herkomst: eigen fok
- Keuze voor deze dieren: omdat deze muizen een immuun defect hebben, beschikken ze niet over T, B of NK cellen, maar wel over myeloïde cellen en macrofagen. Daardoor accepteren ze humane cellen en stoten deze niet af (geldt voor zowel stromale-, endotheel- en tumorcellen) maar ondanks de immuun deficiëntie zijn het zeer sterke muizen, waarbij we zeer weinig uitval zien in experimenten.
- Onderdeel A1: bio-banking  
Met gemiddeld 50 te onderzoeken patiënten monsters per jaar, met 3 muizen per monster komt het aantal muizen voor de duur van het project (5 jaar, 150 per jaar) op 750.
- Onderdeel A2: botmetabolisme en stroma functie  
A2a. Voor experimenten in het kader van bot metabolisme verwachten we gemiddeld 10 experimenten per jaar uit te voeren en met 6 dieren per experiment) komt het aantal voor de duur van het project (5 jaar, 60 per jaar) op 300 muizen.  
A2b. Voor experimenten in het kader van stroma functie/leukemogenese verwachten we gemiddeld 20 experimenten per jaar uit te voeren; met 6 dieren per experiment komt het aantal voor de duur van het project (5 jaar, 120 per jaar) op 600 muizen.  
Om deze aantallen dieren te kunnen produceren in de eigen fok zijn 90 muizen per jaar nodig (man en vrouw samen) dus 450 voor de duur van het project van 5 jaar  
Voor onderdeel A van het project komt het totaal aantal dieren **2100** voor de looptijd van het project van 5 jaar  
De muizen kunnen vanaf een leeftijd van ongeveer 8-10 weken ingezet worden voor de experimenten

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

### Vervanging

Voor dit project is het kunnen werken met primair patiënten materiaal essentieel. Na vele tientallen jaren van onderzoek is de situatie nog altijd zo dat van patiënten afkomstige leukemie/myeloom cellen nauwelijks of geen uitgroei vertonen in in vitro kweekomstandigheden. Dit geldt met name voor multipel myeloom cellen; deze groeien nooit uit in vitro. Maar ook voor acute leukemie wordt gerapporteerd dat slechts een beperkt aantal monsters uitgroeien (en dan slechts in co-cultures met ondersteunend stroma). Maar of er in die situaties ook leukemische stamcellen uitgroeien (wat uiteraard een voorwaarde is) wordt ernstig betwijfeld. Het lijkt erop dat de groei beperkt blijft tot de meer uitgerijpte stadia van de leukemiecelpopulatie. Dat past ook wel bij de waarneming dat de gedifferentieerde cellen ook bij patiënten buiten het beenmerg (dus stroma-onafhankelijk) kunnen groeien. Onze ervaring is dat in de gehumaniseerde [REDACTED] zowel de leukemische stamcellen, evenals de rijpere stadia van leukemiecelpopulatie uitgroeien. Dat sluit ook aan bij onze ervaring bij experimenten waarin we zien dat na oncogen-activatie in normale humane hematopoietische stamcellen (HSC) leukemische transformatie naar acute myeloïde leukemie in een muizenbeenmerg omgeving níét plaatsvindt, althans er is geen uitgroei van myeloïde leukemie, maar er ontwikkelen zich uitsluitend acute lymfatische leukemiën. Blijkbaar "ontbreekt" er iets essentieels in de muizen beenmerg/stroma omgeving wat wel aanwezig is in de gehumaniseerde [REDACTED]

Verder is het zo dat experimenten in het kader van botvorming niet in vitro uitgevoerd kunnen worden omdat depositie van bot in vitro niet plaatsvindt. Dit sluit ook de mogelijkheid uit om experimenten m.b.t. osteolyse en het tegengaan daarvan uit te voeren. In het [REDACTED] zijn experimenten m.b.t. zowel botvorming als osteolyse uitvoerbaar. Ook het genetisch aanpassen van de stroma omgeving en het bestuderen van de invloed daarvan op de uitgroei van primair patiënten materiaal is niet in vitro uitvoerbaar. Op grond van bovenstaande argumenten is de conclusie dat er voor dit type in vivo experimenten geen vervanging mogelijk is.

#### **Vermindering**

Door het plaatsen van 6 [REDACTED] in één muis (met 3 muizen per experiment voor onderdeel A van het project: karakterisering/biobanking en botmetabolisme) kunnen er per muis meerdere waarnemingen worden gedaan met betrekking tot uitgroei van tumoren en botvorming. Tegelijkertijd kunnen er binnen hetzelfde experiment, in voldoende mate tumorcellen worden geëxpandeerd voor bio banking van materiaal ten behoeve van vervolgonderzoek.

#### **Verfijning:**

Primair myeloom monsters groeien niet in muizen weefsels, ook niet in muizenbot, daarom geeft het laten uitgroeien van primair myeloma materiaal in een subcutaan aanwezige [REDACTED] omgeving voor de dieren minimaal ongerief. Ook de uitgroei van tumoren van acute leukemie en de andere typen beenmergtumor in dit project, myelodysplasie en myelofibrose op een subcutane locatie geeft minder ongerief dan wanneer de tumoren in de organen c.q. botten van de muizen groeien (wat na een intraveneuze injectie wel kan gebeuren) omdat dit gepaard kan gaan met orgaanvergroting van bijvoorbeeld milt, lever, ovaria) en dat dan wel meer ongerief kan geven. Het gebruik van het [REDACTED] kan als verfijning worden aangemerkt.

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.

Op alle relevante momenten in het experiment wordt actie ondernomen om pijn, lijden of angst te verminderen door:

- het plaatsen van de [REDACTED] geschiedt terwijl de dieren onder narcose zijn; direct na de operatie wordt een antagonist toegediend, gecombineerd met pijnstilling en de dieren komen bij op een warmtemat. De eerste dagen na de implantatie worden de hechtingen gecontroleerd totdat geconstateerd wordt dat de operatiewond is genezen;
- de injectie van tumorcellen [REDACTED] c.q. intra-cardiaal) geschiedt onder narcose;
- het meten van de tumoren geschiedt doorgaans met twee personen zodat dit snel en efficiënt kan plaatsvinden;
- bloedafname is door middel van handfixatie en wangprik, hetgeen als een van de minst belastende methoden wordt beschouwd.

## **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 dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek en worden niet ook elders getest. Het gehumaniseerde [REDACTED] model zelf is uniek en er is nogal wat specifieke ervaring voor nodig om dit met succes toe te passen. Die is in onze groep aanwezig, aangezien we dit model zelf ontwikkeld hebben. Op enkele laboratoria in het buitenland wordt het model ook gebruikt, maar dat is dan in samenwerking met ons en de onderzoeken zijn op elkaar afstemd zodat er geen onnodige duplicaties voorkomen.

## **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.

gf

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Pijn zou kunnen optreden als gevolg van de operatie waarbij via maximaal drie huid-incisies subcutaan [REDACTED] worden geïmplanteerd. Deze procedure geschiedt onder narcose en wordt al vele jaren, met goede ervaringen, door ons toegepast. Na de operatie en als de huid is gehecht wordt er, indien van toepassing, een antagonist toegediend, met post-operatieve pijnstilling. Tijdens het herstel van de operatie staan de dieren op een verwarmde mat.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Uitgroei van tumoren bij de [REDACTED] subcutaan

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Uitgroei van tumoren bij de [REDACTED] subcutaan

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

Op de plaatsen waar de [REDACTED] zijn geïmplanteerd en waarin de tumorcellen zijn geïnjecteerd of naar toe zijn gemigreerd, is de verwachting dat er tumoren zullen gaan groeien. Dit is ook het doel van het experiment. Het patroon van uitgroei van tumoren in en bij de [REDACTED] (mogelijk vanaf week 4, meestal later), is niet goed te voorspellen omdat elke patiënt anders kan zijn (in feite anders is). In muizenweefsels groeien patiënten leukemie - myeloom cellen niet.

In de eerste periode is er een twee-wekelijkse visuele inspectie. Zodra er tumorgroei zichtbaar wordt (als "bobbeltje"), gaan onderzoekers afhankelijk van snelheid van groei eenmaal per 1 á 2 weken de tumoren opmeten.

### 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.

Hiervoor hanteren we het volume van de tumoren. In de loop van het experiment zullen er naar verwachting tumoren ontstaan bij de [REDACTED]. Zodra tumoren duidelijk groter worden, worden de afmetingen daarvan met een schuifmaat bepaald.

Humaan Eind Punt:

Tumor volume mag maximaal, met correctie voor de [REDACTED] en huid 1,3 cm<sup>3</sup> bedragen. De formule die gehanteerd wordt voor volume berekening is  $\text{volume} = \pi \times 6(L \times B \times H)$  referentie Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989).

*Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. Cancer Chemother and Pharmacol 24(3), 148-154).*

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

Door goed te monitoren en tijdig actie te ondernemen kan voorkomen worden dat de dieren om redenen van het bereiken van het humane eindpunt gedood moeten worden.



### K. Classificatie van ongerief

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

Ongerief: **matig**".

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Zodra de dieren een tumor hebben ontwikkeld die voldoende tumorcellen bevat om in te kunnen analyseren en op te slaan in de biobank is het einddoel van het experiment bereikt en geslaagd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 11400   |            |                |   |   |
|---|---|------------|----------------|---|---|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUMC), Amsterdam  |            |                |   |   |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td><b>Therapie ontwikkeling in het hu [REDACTED] muis model; chemotherapie en/of immuno-chemo-combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"</b></td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | <b>Therapie ontwikkeling in het hu [REDACTED] muis model; chemotherapie en/of immuno-chemo-combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"</b> |
| Volgnummer  | Type dierproef  |            |                |   |   |
| 2   | <b>Therapie ontwikkeling in het hu [REDACTED] muis model; chemotherapie en/of immuno-chemo-combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"</b>   |            |                |   |   |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit type dierproef ligt de focus op het testen en ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden voor klinische toepassing bij patiënten met hematologische maligniteiten. Er wordt onderzoek gedaan naar de oorzaken en de kenmerken van therapie resistentie en hoe deze te doorbreken is door óf een alternatieve chemotherapie, óf door behandeling met monoclonale antilichamen óf met cellulaire immuuntherapie óf met een combinatie van deze. Wat in dit opzicht speciaal door ons onderzocht wordt is in hoeverre het type behandeling invloed heeft op de multilokalen samenstelling waardoor de meeste tumorcelpopulaties bij de patiënten door gekenmerkt worden en in hoeverre de "clonale getijden" zich voordoen (of mogelijk onderdrukt worden, door de toegepaste therapie (zie ook de bijlagen: Schematisch overzicht "Principe van de behandeling ....").

De **keuze** voor het [REDACTED] bij dit onderdeel van het project is met name gebaseerd op het gegeven dat in dit model tumorcellen van patiënten van onze doelgroep (acute leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie en myelofibrose, engraften en uitgroeien, én waarbij de tumorcellen dezelfde kenmerken behouden als die in de patiënten ook hadden. Dit biedt de mogelijkheid om de oorspronkelijke tumorcelpopulaties in hun "natuurlijke omgeving" te testen. (zie ook de bijlagen: artikel in Biotechniek, 2013).

#### Globale aanpak bij de experimenten met chemotherapie:

Muizen krijgen subcutaan met stamcellen [REDACTED] geplaatst.

Enige tijd later (na minimaal 6- 8weken) worden van de patiënt afkomstige tumorcellen hierin geïnjecteerd.

De uitgroei van tumoren wordt gevolgd door regelmatig visuele inspectie en door bloedanalyse.

Als er tumorgroei geconstateerd wordt, of volgens een vooraf bepaald schema, krijgen de dieren een therapie toegediend, dit kan zijn eerst een "standaard therapie", in het Engels "standard-of-care, SoC" (die in beginsel bestaat uit dezelfde medicatie als waar de cellen in de patiënt aan waren blootgesteld), gevolgd door een experimentele therapie. Deze kan zijn: (i) chemotherapie; (ii) immuuntherapie met monoclonale antilichamen; (iii) cellulaire immuuntherapie of (iv) combinatie immuun en/of chemotherapie. De (combinatie) therapieën die in het [REDACTED] worden getest, zijn qua opzet vergelijkbaar met wat op een later moment klinisch zal worden toegepast.

### Primaire uitkomstparameters

- 1 de meest relevante parameter is remming van tumorgroei, in eerste instantie door de chemotherapie (Standard of Care (SoC)) en hoe deze verder wordt gereduceerd door de aanvullende (experimentele) therapie d.m.v. het meten van subcutane tumoren met schuifmaat (om groeisnelheid te bepalen) en mede om zodoende vóór het bereiken van het humane eindpunt het experiment te kunnen stoppen
- 2 als laboratorium parameters, worden de tumoren post mortem, uitgebreid geanalyseerd, genetisch (whole exome sequencing), met FACS, immunohistochemie van de tumor in situ, eventueel met Stof analyse. Tevens kan het stroma van de [REDACTED] worden opgekweekt om te analyseren wat het hebben van interactie met tumorcellen aan genexpressie veranderingen heeft teweeg gebracht. Al deze analyses zijn reeds door onze beproefde methoden, die routinematig worden uitgevoerd.
- 3 voor specifieke experimenten kunnen de tumorcellen met merkgenen worden gemarkeerd (luciferase/GFP of bijvoorbeeld mCherry) en de uitgroei van de gemarkeerde cellen kan dan met bioluminescentie/fluorescentie gevolgd worden; het experiment kan dan gestopt worden op basis van een maximaal signaal (dat gecorreleerd is aan tumorgroei/tumor grootte). De experimenten worden niet standaard met gemarkeerde cellen uitgevoerd, omdat we in de regel de uitgroei van "niet-gemanipuleerde" tumorcellen willen kunnen bestuderen. Het valt niet uit te sluiten dat genetische markering tevens leidt tot selectie. Soms is dat wel acceptabel, soms ook niet; dit hangt af van het beoogde doel van het betreffende experiment.  
De experimenten worden uitgevoerd met immuun-deficiënte muizen (RAG2GC KO) omdat deze humane cellen niet afstoten en zich bewezen hebben voor dit type onderzoek.

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.

### Fase I:

1. terwijl muizen onder narcose zijn worden ze eerst geschoren en daarna worden er maximaal drie incisies gemaakt, in de huid, op het midden van de rug
2. aan weerszijden wordt een "subcutane pocket" gemaakt waarin met stromale stamcellen [REDACTED] (2x3 mm) worden geschoven (max 6 per muis).
3. de huid wordt gehecht en indien relevant wordt een narcose antagonist in combinatie met post-operatieve pijnstilling toegediend.

### Fase II.

4. als voorbereiding op de injectie van tumorcellen krijgen de dieren 1 dag van tevoren een totale lichaamsbestraling met een lage dosis (1,5 Gy) X-ray equivalent. Dit bevordert het "aanslaan" en de uitgroei van de tumor; hierna worden de dieren 2-wekelijks geobserveerd voor tumor uitgroei en zodra er tekenen zijn van groei, wordt met de schuifmaat de grootte/groei daarvan bepaald; in het geval dat de tumorcellen gemarkeerd zijn met luciferase/fluorescerende eiwitten, wordt optical imaging gebruikt om de tumorgroei en response te monitoren.
5. vanaf 4 - 8 weken na injectie van tumorcellen krijgen de dieren chemotherapie; afhankelijk van het middel wordt dit meer of minder frequent toegediend, volgens bekende injectie routes; bij voorkeur i.p. of subcutaan en volgens doseringen en schema's die in de literatuur als effectieve en getolereerde doseringen zijn beschreven. De doseringen die worden toegediend zijn sublethaal: d.w.z. de maximaal getolereerde dosis (MTD) of lager.
6. de dieren krijgen ofwel de SoC behandeling gevolgd door een experimentele therapie (ofwel chemotherapie, of immunotherapie met monoclonale antilichamen, of cellulaire immunotherapie, of combinaties van deze).

### Behandelingen met chemotherapie/immunotherapie en de onderbouwing daarvan

De behandeling die wordt toegediend verschilt per type tumor; zo is de standaardtherapie voor muizen waarin **Acute Leukemie (AL)** groeit, de combinatie van cytosine arabinoside (Ara-C) en doxorubicine (Doxo, volgens een schema van 5 dagen Ara-C + 3 dagen doxorubicine (referentie Wunderlich Blood. 2013 21;121(12)). Tijdens de therapie wordt de algehele conditie van de dieren beoordeeld en het lichaamsgewicht wordt bepaald als indicatie voor de gezondheidstoestand van het dier.

- Muizen waarin **multipel myeloom (MM)** groeit krijgen ook dezelfde medicatie als patiënten krijgen toegediend; bij MM kan dat nogal variëren en dat kan zijn melphalan, dexamethason, cyclofosfamide, lenalinomide, pomalidomide of bortezomib (respectievelijk alkylerende agentia, IMiDS (immunomodulerende drugs) of proteasoom remmers)
- Muizen waarin tumorcellen van **myelodysplasie (MDS)** patiënten groeien krijgen een behandeling met methyltransferase remmers, zoals decytabine (dacogen)
- Bij **myelofibrose (MF)** patiënten is de behandeling afhankelijk van het ziekteverloop. Momenteel worden MF patiënten steeds vaker met specifieke JAK-2 kinase remmers behandeld. Deze behandeling is, weliswaar tijdelijk, zeer effectief, maar niet genezend. MF evolueert frequent naar een AML die dan, ook in onze muizen, met AML schema behandeld gaat worden (Ara-C en Doxorubicine 5+3), waarna experimentele therapie volgt.

In het vervolgtraject krijgen de muizen experimentele therapie toegediend, die erop gericht is om de resistente tumorcellen in de fase van Minimale Residuele Tumorload (MRT) te elimineren. De experimentele therapeutica die worden onderzocht in het [REDACTED] bevinden zich in een translationeel ontwikkeltraject en waarvoor geldt dat bij bewezen effectiviteit in het [REDACTED] dit er aan kan bijdragen om deze middelen voor patiënten beschikbaar te krijgen. Therapeutica die op dit moment op ons programma staan zijn o.a. compounds die uit in vitro screeningsprogramma's als veelbelovend te voorschijn komen (in totaal werden 180,000 compounds gescreend waarvan uiteindelijk enkele tientallen geselecteerd worden voor in vivo testen), telomeraseremmers, nieuw geïdentificeerde monoclonale antilichamen tegen tumorspecifiek antigenen, en soms genetisch aangepaste immuuncompetente cellen (waaronder bijvoorbeeld CAR-T, CTL, NK of CAR-NK, etc).

De monoclonale antilichamen worden 1 x per week, of 1 x per 2 weken toegediend (hangt af van de halfwaardetijd in

bloed); chemotherapeutica die op specifieke targets in de tumorcellen aangrijpen (zoals bijvoorbeeld kinase remmers of epigenetische effecten hebben) worden in het algemeen in één of meer cycli van 5 dagen éénmaal daags toegediend via intraperitoneale injecties. Bij cellulair immuuntherapie worden de cellen via intraveneuze injecties toegediend. In alle gevallen worden de MTD dosering of lager toegepast; lethale doseringen worden niet toegediend.

De groei van de tumorcellen wordt zowel bij de controledieren als de behandelde dieren gemonitord (visuele inspectie, schuifmaatmetingen en bloedmonsteranalyse). Zodra een tumor duidelijk is gegroeid of na een aanvankelijke reactie op de toegediende therapie weer is gaan groeien volgt euthanasie en worden de tumoren, met verschillende analysetechnieken in het laboratorium onderzocht. Euthanasie wordt toegepast zodra het bereiken van een humane eindpunt zich aankondigt (in dit geval een maximaal tumorvolume van  $\pm 1,3 \text{ cm}^3$ ). Daarna wordt er tumormateriaal en muizenweefsels verzameld om daarin (i) de aanwezigheid en de verhouding van de verschillende (sub-) clones in te bepalen,, (ii) het genexpressie patroon wordt bepaald (whole exoom sequentie analyse); (iii) er wordt gekeken met CytoF analyse naar celoppervlak kenmerken en (iv) en met CyToF welke van de bekende intracellulaire signaleringsroutes actief zijn. Hierbij zullen de analyse resultaten van de tumorcellen van de behandelde dieren vergeleken worden met die van de controle dieren. Uit al deze gegevens verwachten we te kunnen analyseren op basis waarvan de tumorcellen resistent zijn voor de toegediende therapie, of we er wel of niet in geslaagd zijn om deze te doorbreken en of de immuuntherapie met antilichamen en/of cellulair therapie effectief is bij chemo-resistente tumorcellen.

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

Bij het bepalen van het aantal dieren dat er voor de hier beschreven experimenten nodig is hebben we de volgende overwegingen. We beschouwen een therapie "effectief" als er een afname is van meer dan 40% in tumorload, maar een effectieve therapie kan ook leiden tot een afname tot beneden 1% of zelfs daaronder. (nb om leukemie te genezen moet er bij patiënten meer dan  $10^{11}$  tumorcellen (11 decaden) en bij een muis met redelijk grote tumoren al snel  $10^9$  tumorcellen (9 decaden) worden geëlimineerd; (1 % is 2 decaden, 0,01% is 4 decaden).

Een statistische power analyse vooraf, leert ons dat om dergelijke grote verschillen met voldoende "power" te kunnen waarnemen er niet veel dieren per groep nodig zijn; 4 dieren is daarvoor genoeg. Bovendien hebben de dieren op maximaal 6 plaatsen een [REDACTED] met tumor, hetgeen (hoewel niet geheel onafhankelijk) tot 24 waarnemingen per experimentele groep mogelijk maakt. Aan de andere kant moge het duidelijk zijn dat als een tumor resistent is voor een bepaalde behandeling er geen verschil tussen de groepen verwacht wordt; ook hiervoor zijn niet veel dieren per groep nodig en kan ook in die gevallen met 4 dieren per groep worden volstaan.

Ook wanneer dieren worden gevolgd met bioluminescentie imaging is het aantal van 4 dieren een goed aantal gebleken om met voldoende statistische significantie en power experimenten te kunnen evalueren. Met BLI kunnen de tumoren in de afzonderlijke [REDACTED] worden gemeten hetgeen het aantal meetpunten per dier/groep maximaal 24 brengt, hetgeen de power van het analyse resultaat doet toenemen.

Bij toepassing van BLI om tumor response te meten is het effect zelfs over een range van 3-4 decaden prima te volgen (factor duizend tot 10-duizend tumorgroei vanaf threshold van  $\pm 50,000 \text{ luc+}$  cellen per [REDACTED]).

Voor het inschatten van het aantal dieren per experiment groep is een poweranalyse uitgevoerd met het programma StatMate 2.0 (onderdeel van GraphPad Prism), bijgevoegd (zie bijlagen).

## B. De dieren

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

Diersoort: muizen, volwassen (vanaf leeftijd 8-9 weken)

Sekse: vrouwelijke dieren. De reden dat alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden bij deze experimenten is omdat in het verleden, bij herhaling, is gebleken dat mannelijke dieren na de operatie solitair gehuisvest moesten worden (om de huidwond/hechting te laten herstellen) en als ze meteen of later bij elkaar worden gezet resulteert dit direct ernstige onderlinge gevechten. In het verleden leidde dit óf al in de eerste fase van het experiment óf op een later moment in het experiment tot uitval. Daarbij geeft (langdurige) solitaire huisvesting langdurig ongerief. Dit alles is te vermijden door alleen vrouwelijke dieren voor deze experimenten te gebruiken. Bij het type experimenten dat wij uitvoeren is nooit gebleken dat de sekse van de dieren invloed heeft op de resultaten van het onderzoek. Wij realiseren ons dat dit bij de fok een overschot aan mannelijke dieren oplevert. Deze worden bij de spendatum afgevoerd; er wordt echter wel met een gericht oog gekeken naar mogelijkheden om de mannelijke dieren voor andere studies te gebruiken.

Herkomst: eigen fok

Stam: RAG2GC-KO

Keuze voor deze dieren: omdat deze muizen een immuun defect hebben, beschikken ze niet over T, B of NK cellen, maar wel over myeloïde cellen en macrofagen. Daardoor accepteren ze humane cellen en stoten deze niet af (geldt voor zowel stromale-, endotheel- en tumorcellen) maar ondanks de immuun deficiëntie zijn het zeer sterke muizen, waarbij we zeer weinig uitval zien in experimenten.

### Aantallen dieren:

Voor deel B van het project (dierproef type 2) zullen er per jaar gemiddeld 25 experimenten worden uitgevoerd, verdeeld over de verschillende hematologische tumortypen, chemotherapie experimenten, immunotherapie experimenten en combinaties daarvan. Per experimentele groep worden 4 muizen gebruikt; het aantal experimentele groepen per experiment loopt uiteen van 2 tot 8 (afhankelijk van het aantal variabelen dat binnen 1 experiment getest wordt); maar

met een gemiddeld aantal van 4 groepen per experiment leidt dit tot gemiddeld 400 muizen per jaar en tot een totaal van 2000 muizen voor de looptijd van dit project van 5 jaar. Om deze aantallen dieren te kunnen produceren in de eigen fok zijn 110 muizen per jaar nodig (man en vrouw samen) dus 550 voor de duur van het project van 5 jaar.  
Het totaal aantal dieren voor deel B van het project komt op **2550** dieren voor de looptijd van dit project van 5 jaar.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging

Op de eerste plaats is het voor de experimenten die in dit deel van het project beschreven zijn, essentieel om te kunnen werken met primair patiënten materiaal. Zoals al bij het type 1 dierproef is betoogd is het niet mogelijk om primaire cellen van patiënten in vitro te laten groeien. Daarvoor is het [REDACTED] wel uitermate geschikt voor gebleken. Nu is het wel zo dat het ontwikkelen van nieuwe therapeutica voor de behandeling van hematologische tumoren start met een in vitro traject waarbij aan de hand van in vitro experimenten nieuwe middelen (chemotherapeutica, monoclonale antilichamen of tumor specifieke immuun competente cellen) worden gezocht, gemaakt of ontwikkeld, met de bedoeling om deze klinisch te gaan toepassen. Maar het in vitro creëren van de condities waarin de tumorcellen zich in vivo bevinden (bot+stroma+bloedvaten) is technisch (nog) niet mogelijk. Toch is dat van groot belang omdat het in de laatste jaren duidelijk is geworden dat fenomenen zoals ontstaan van resistentie van de tumorcellen voor chemotherapie en ook voor immuuntherapie, voor een belangrijk gedeelte mede door omgevingsfactoren wordt bepaald. Dit betreft dan (voor de hematologische tumoren) de beenmerg-stroma-bloedvat omgeving waarin de tumorcellen zich bevinden en waar de chemotherapie en immuuntherapie effectief moeten zijn. Hier bevinden zich ook de plaatsen waar de tumorcellen "ontsnappen" aan de therapie en resistent worden.

Het in vitro scheppen van deze condities is vooralsnog niet mogelijk; natuurlijk kunnen tumorcellen samen met stroma worden gekweekt, soms zelfs in 3-D systemen, maar het "levend" houden van primaire cellen in dergelijke systemen is (tot op heden) niet mogelijk gebleken. Hier wordt uiteraard wel onderzoek aan gedaan. Ook wijzelf zijn bezig met het ontwikkelen van een 3-D in vitro systeem, en tegelijk met het uitvoeren van experimenten in ons in vivo model proberen we dit 3-D systeem te valideren; want alleen een gevalideerd systeem is een reëel proefdier-vervangend model systeem. Zolang het nog niet zover is, is het in [REDACTED] model dat wij ontwikkeld hebben, voorlopig het meest geschikte model om therapie-resistentie en het doorbreken daarvan te onderzoeken, omdat het condities oplevert die meest dicht in de buurt komen van de tumoromgeving bij patiënten.

De kracht van het door ons gebruikte [REDACTED] is dat tumorcellen getest kunnen worden terwijl deze zich in vergelijkbare omstandigheden bevinden als waarin ze bij patiënten aanwezig zijn. Daar komt bij, dat bepaalde vormen van immuuntherapie, zoals antilichaam therapie en cellulaire therapie vragen om een intact organisme (complement-effector cellen-bloedcirculatie) waarin de omgevingscomponent zoals endotheel, stroma, bot etc. aanwezig zijn. Op grond van bovenstaande argumenten is conclusie dat er voor dit type in vivo experimenten geen vervanging mogelijk is.

#### Vermindering

Het gebruik van het [REDACTED] voor de experimenten die gericht zijn op therapieontwikkeling leidt ertoe dat er minder dieren nodig zijn om toch met voldoende power data te kunnen verkrijgen om de effecten van de toegediende therapie te kunnen evalueren. De reden hiervoor is dat door het plaatsen van meerdere [REDACTED] per muis (maximaal 6), het aantal waarnemingen dat gedaan kan worden met 4 dieren per groep ([REDACTED] voldoende statische power om relevante verschillen tussen de experimentele groepen te kunnen vaststellen. In andere muizenmodel experimenten waar met één intraveneuze injectie van leukemiecellen per muis wordt gewerkt zou het aantal dieren per groep aanzienlijk groter moeten zijn (omdat er maar 1 data punt per muis beschikbaar komt) om met dezelfde power relevante verschillen tussen de groepen te kunnen vaststellen.

**Verfijning:**

In standaard tumor diermodellen wordt vaak gewerkt met muizen tumoren, of met humane cellijnen in immuundeficiënte muizen omdat primaire cellen doorgaans niet in muizen uitgroeien. Daardoor wordt het moeilijker om de vertaalslag naar de patiënt te maken. Doordat onze experimenten gedaan worden in een gehumaniseerde omgeving, waarin de cellen van individuele patiënten getest kunnen worden, kunnen de resultaten daarvan veel directer vertaald worden naar klinische toepassing

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.

Op alle relevante momenten in het experiment wordt actie ondernomen om pijn, lijden of angst te verminderen of tot een minimum te beperken, met name:

- het plaatsen van de ██████ geschiedt terwijl de dieren onder narcose zijn; direct na de operatie wordt een antagonist toegediend, gecombineerd met pijnstilling en de dieren komen bij op een warmtemat. De eerste dagen na de implantatie worden de hechtingen gecontroleerd totdat geconstateerd wordt dat de operatiewond is genezen;
- de injectie van tumorcellen geschiedt onder narcose;
- het meten van de tumoren met een schuifmaat, geschiedt doorgaans met twee personen zodat dit snel en efficiënt kan plaatsvinden; er is een duidelijk HEP gedefinieerd
- bloedafname is door middel van wangprik met handfixatie, hetgeen als een van de minst belastende methoden wordt beschouwd
- bij experimenten die met optical imaging worden vervolgd worden de dieren onder isofluraan narcose, liggend op een verwarmd plateau, gemeten
- bij euthanasie worden de dieren met koolzuurgas gedood en worden de ██████ met de tumoren en overige weefsels verzameld voor verder onderzoek.

## 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.

Het gehumaniseerde ██████ model is door ons zelf ontwikkeld en er is nogal wat specifieke ervaring voor nodig om dit met succes toe te gebruiken. Die ervaring is ruimschoots in onze groep aanwezig. Op enkele laboratoria (een in Nederland en twee laboratoria in het buitenland) wordt het model ook gebruikt, maar dat is dan in samenwerking met ons en de onderzoeken zijn op elkaar afstemd, zodat er geen onnodige duplicaties voorkomen. Deze dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek en worden niet ook elders getest. In ons programma worden weliswaar vergelijkbare experimenten uitgevoerd, maar dit betreft dan altijd óf een nieuwe patiënt die getest wordt, óf er wordt een nieuw middel in dezelfde proefopzet getest. Tussen patiënten bestaan er veel overeenkomsten maar ook veel verschillen. Om deze beide te kunnen definiëren moeten er toch behoorlijk veel patiënten getest worden. Van de toch grote aantallen patiënten bij wie de ziekte zich openbaart testen wij nog een beperkt aantal, maar wel zoveel dat we tot duidelijke conclusies kunnen komen, met betrekking tot de doelstellingen van de verschillende experimenten.

## 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.

Pijn zou kunnen optreden als gevolg van de operatie waarbij via max. drie huid-incisies subcutaan [REDACTED] worden geïmplant. Deze geschiedt onder narcose en wordt al vele jaren, met goede ervaringen, door ons toegepast. Na de operatie en als de huid is gehecht wordt er indien van toepassing een narcose antagonist toegediend; in combinatie met postoperatieve pijnbestrijding. Tijdens het herstel van de operatie staan de dieren op een verwarmde mat.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Bij de dieren die voor experimenten worden ingezet voor studies groeien de humane tumorcellen vrijwel uitsluitend in de gehumaniseerde [REDACTED]. De muizen hebben dus subcutane tumoren, maar geen groei van tumorcellen in de muizenorganen, en daardoor geeft dit geen aanvullend ongerief.

De dieren krijgen gedurende een bepaalde periode chemotherapie. Dit verschilt per experiment type, maar kan enkele weken duren.

Aangezien chemotherapie ook bij de patiënt ongerief geeft, geeft dit ook bij de muizen ongerief. Bij immunotherapie zal dit (omdat dit geen bijwerkingen kent) veel minder het geval zijn dan bij cytostatica behandeling.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het ontstaan van tumoren is het beoogde/verwachte resultaat van het experimenten die worden gedaan. Deze tumoren groeien/ontstaan alleen op die plaatsen waar de [REDACTED] zijn geïmplant of waarin tumorcellen zijn geïnjecteerd of waar ze naar toe migreren. Uitgroei van tumoren in muizenweefsels komt bij multipel myeloom niet voor en als er groei is van leukemie tumoren kán groei elders plaatsvinden, is meestal beperkt tot voornamelijk beenmerg en soms milt; en meestal alleen tijdens eindstadium van de ziekte.

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

Het patroon van uitgroei van tumoren in en bij de [REDACTED] (zelden vóór week 4, meestal later), is niet goed te voorspellen, omdat elke patiënt anders is (kan zijn). In de eerste periode is er een tweewekelijkse visuele inspectie. Zodra er tumorgroei zichtbaar wordt (als "bobbeltje"), gaan onderzoekers afhankelijk van snelheid van groei 1 maal per 2 weken de tumoren opmeten (in latere fase elke week) om tijdig te kunnen ingrijpen als de tumoren te groot dreigen te worden. Daarvoor is als humaan eindpunt (tumor volume) gedefinieerd. In experimenten waarin met luciferase gemarkeerde tumorcellen wordt gewerkt, wordt de groei van de tumorcellen met bioluminescentie imaging gevolgd.

### 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.

Hiervoor hanteren we het volume van de tumoren. In de loop van het experiment zullen er naar verwachting tumoren ontstaan bij de [REDACTED]. Zodra tumoren duidelijk groter worden, worden afmeting met schuifmaat bepalen. Humaan Eind Punt: Tumor volume mag maximaal 1 cm<sup>3</sup> cc worden (met correctie voor de [REDACTED] en huid van 1,3 cm<sup>3</sup>); de formule die gehanteerd wordt voor volume berekening is  $\text{volume} = \pi \times \text{Lx} \times \text{BxH}$  referentie Tomayko, M. M., & Reynolds, C. P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 24(3), 148–154

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

Door goed te monitoren en tijdig actie te ondernemen kan voorkomen worden dat de dieren om redenen van het bereiken van het humane eindpunt gedood moeten worden.

### K. Classificatie van ongerief

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

Ongerief: "matig"

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Aan het einde van het experiment worden de dieren gedood om post mortem de tumoren die in de [REDACTED] zijn gegroeid te kunnen analyseren.

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



**Poweranalyse voor studies in het kader van onderdeel B.**

**Chemotherapie en/of immuno-chemo combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden" (dierexperiment type 2).**

Uitgangspunt:

Het doel is om met de toegediende chemo- of immuno- of combinatie therapie een relevante reductie in tumorgroei te realiseren ten opzichte van de tumorload in de controle dieren. Die reductie moet minimaal 40% bedragen\*.

\*\*\*\*\*

Hiervoor is een analyse is ingevoerd m.b.v. GraphPad StatMate 2.0a, onderdeel van GraphPad prism software.

*Your choices:*

*Test chosen: Sample size for unpaired t test*

*Expected SD of each group = 20*

*Significance level (alpha) = 0.05 (two-tailed)*

*You requested a detailed explanation for N = 4 and 80% power.*

Assume that the true difference between means is 46.81. Now imagine that you perform many experiments, with N = 4 per group in each experiment. Due to random sampling, you won't find that the difference between means equals 46.81 in every experiment. Instead, you'll find that the difference between means will be greater than 46.81 in about half the experiments, and less than 46.81 in the other half.

In 80 % (the power) of those experiments, the P value will be less than 0.05 (two-tailed) so the results will be deemed 'statistically significant'. In the remaining 20 % of the experiments, the difference between means will be deemed "not statistically significant", so you will have made a Type II (beta) error.

Summary: A sample size of 4 in each group has a 80 % power to detect a difference between means of 46.81 with a significance level (alpha) of 0.05 (two-tailed).

Alternative explanation using confidence interval:

If you perform many experiments with N = 4 in each group, you expect that in 80 % of these experiments (the power) the width of the 95 % confidence interval for the difference between means will extend 46.81 or less in each direction. In the remaining 20 % of the experiments, you will expect the 95 % confidence interval to be wider than that.

Table of tradeoffs:

For any combination of sample size (N) and power, this table shows the difference between means that can be detected.

| N per group | Power        |              |              |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
|             | 90%          | 85%          | 80%          |
| 2           | 100.13       | 92.56        | 86.54        |
| 3           | 67.34        | 62.25        | 58.20        |
| <b>4</b>    | <b>54.16</b> | <b>50.07</b> | <b>46.81</b> |
| 6           | 41.51        | 38.37        | 35.87        |
| 8           | 34.94        | 32.29        | 30.20        |
| 12          | 27.78        | 25.68        | 24.01        |
| 16          | 23.75        | 21.96        | 20.53        |
| <b>24</b>   | <b>19.16</b> | <b>17.71</b> | <b>16.56</b> |

\*\*\*\*\*

**Conclusie:**

Opzet experiment met 4 dieren (met [redacted]) per groep:

Een reductie in tumorgroei van 40% is waarneembaar.

Als we kijken naar individuele [redacted] [redacted], 24 in totaal) als waarneming dan is een verschil van 18 % nog met 80% power vast te stellen.

\*: Onze eerdere studies hebben laten zien dat een 40% reductie bij therapie gevoelige tumoren goed haalbaar is (soms is de afname nog heel veel groter); bij therapie resistente tumoren zal de afname (per definitie) veel minder zijn, maar dat is met 4 dieren (met max [redacted] goed aantoonbaar.



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translatieel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

### **Achtergrond.**

De hematologische tumoren van het beenmerg zoals acute leukemie (AL), het multipel myeloom (MM, oftewel ziekte van Kahler), en de myeloproliferatieve neoplasie (MPN) myelodysplasie (MDS) en myelofibrose (MF) zijn moeilijk te genezen ziekten, waaraan nog altijd meer dan 50% van de acute leukemie patiënten en meer dan 90 % van de myeloma patiënten binnen een periode van 2 tot 5 jaar na het ontdekken van de ziekte, zal overlijden. Bij de myeloproliferatieve neoplasias (MDS en MF) treedt er na een kortere of langere periode van een verstoorde bloedcelproductie vaak een evolutie of transformatie op naar een acute leukemie. De behandeling die de patiënten krijgen hangt af van velerlei factoren; zo speelt het type tumor en de genetische afwijkingen waardoor deze gekenmerkt worden een rol, maar ook het stadium van ziekte waarin de patiënt zich bevindt, leeftijd en conditie van de patiënt enzovoorts. In het algemeen geldt, dat patiënten met hematologische tumoren behandeld worden met chemotherapie, soms gecombineerd of gevolgd door een stamceltransplantatie (hetzij autoloog, hetzij allogeen) en daarna meestal opnieuw chemotherapie, hoewel sinds kort monoclonale antilichaam therapie in opkomst is. Kenmerkend is echter dat bij de patiënten waarbij de ziekte blijft terugkeren ( $\pm$  50% van de AML, 90% van de MM), de tumorcellen een resistentie voor de chemotherapie hebben ontwikkeld.

Om deze therapie resistentie te kunnen doorbreken, moet er een beter inzicht komen wat exact de kenmerken zijn van de resistentie (sub-)populaties tumorcellen die in de therapie resistente patiënten aanwezig zijn. Daarnaast is er een dringende behoefte aan meer selectief (patiënt-specifiek) werkende cytostatica terwijl ook nieuwe vormen van immunotherapie ontwikkeld en getest worden moeten op hun effectiviteit, zowel als monotherapie als in combinatie therapie. Door de complexiteit van het ziektebeeld en de beoogde behandeling is het essentieel om hiervoor geschikte diermodellen te kunnen inzetten.

#### **Keuze van het diermodel**

Voor de translatie van de onderzoeksresultaten naar een behandeling patiënten, biedt het enorme voordelen als het onderzoek is uitgevoerd met tumorcellen die van de patiënt zelf afkomstig zijn. Als deze dan ook nog eens getest zijn in de context waarin deze cellen zich bij de patiënt bevinden; i.c. de micro-omgeving in het beenmerg, geeft dat een extra relevantie. Het beenmerg is namelijk de locatie waar de tumor ontstaat, waar de groei van de tumorcellen wordt gereguleerd door interactie met de stromale omgeving en door de afgescheiden groeifactoren in de zogenaamde "stromale niche". Dit is ook de locatie waar de tumorcellen door de chemotherapie en immunotherapie bereikt moeten kunnen worden, én het is ook de locatie waar de resistentie voor de therapie zich ontwikkelt en waar uiteindelijk de relapse van de ziekte zijn oorsprong kent.

[Redacted text block]

Als daarin vervolgens tumorcellen van de patiënten worden geïnjecteerd, komen ze als het ware in hun eigen "tumor-bed" terecht en dat leidt tot uitgroei van alle typen beenmergtumoren zoals AML, MM, MDS en MF zoals we intussen hebben kunnen vaststellen.

Dit [Redacted] vormt de basis voor alle experimenten die in dit project worden voorgesteld. Het biedt de mogelijkheid om de genetische en fenotypische kenmerken van de tumorcellen, het bijbehorende groeiedrag en de evolutie van de tumorcelpopulatie(s), onder invloed chemo-immunotherapie bij de verschillende hematologisch maligniteiten te onderzoeken, maar daarnaast ook de mogelijkheden om nieuwe vormen van chemotherapie en immunotherapie te ontwikkelen of de effectiviteit van nieuwe chemotherapeutica bij therapie resistentie te testen en onderzoeken naar het doorbreken hiervan uit te kunnen voeren. Omdat steeds duidelijker wordt dat de stromale omgeving in de [Redacted] e in belangrijke mate bijdraagt aan het ontsnappen aan de therapie alsmede het ontstaan van therapie resistentie, is het ook van groot belang dat de stromale component in het onderzoek betrokken kan worden. Het [Redacted] [Redacted] biedt uitgelezen mogelijkheden om al het voorgenomen onderzoek m.b.t. de pathofysiologie van en de therapie-ontwikkeling voor de hematologische tumoren in uit voeren.

### **3.2 Doel**

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

#### **Algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.**

Het experimentele onderzoeksprogramma dat in dit project aan de orde komt bestaat uit twee, sterk samenhangende delen. Ten eerste een deel waarin de experimenten gericht zijn op het ontrafelen van de pathofysiologie van humane beenmergtumoren door meer inzicht te krijgen in de genetische en fenotypische kenmerken van tumorcellen van acute leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie, myelofibrose in relatie tot groei-eigenschappen en therapie resistentie. Op de tweede plaats experimenten die erop zijn gericht om nieuwe chemo-therapeutica, nieuwe monoclonale antilichamen en nieuwe cellulaire immunotherapiën in het preklinisch ontwikkeltraject te testen op hun effectiviteit op primaire tumorcellen, om ze daarna zo snel mogelijk naar klinische toepassing te brengen.

Centraal in deze experimenten staat een eerder door ons ontwikkeld gehumaniseerd muismodel waarin primaire tumorcellen van patiënten kunnen uitgroeien in een humane "beenmergachtige" omgeving, die we in muizen kunnen generen. Dat gehumaniseerde model kunnen we gebruiken voor de bestudering van de pathofysiologie en voor therapie ontwikkeling ten behoeve van deze patiënten met hematologische tumoren. Daarbij ligt de speciale nadruk op tumor-stroma interacties, op het identificeren en doorbreken van therapie resistentie, beide in het kader van "klonale evolutie/klonale getijden\*" aangezien die momenteel een barrière blijkt te vormen om werkelijke vooruitgang te kunnen boeken bij de behandeling van leukemie, multipel myeloom en aanverwante beenmerg tumoren. (\*Met klonale getijden wordt bedoeld, het opkomen en onder invloed van therapie weer verdwijnen maar mogelijk later weer het terugkomen van de verschillende tumorsubpopulaties met kenmerken (bijvoorbeeld specifieke veranderingen in het DNA of op het celoppervlak).

In de bijlagen is schematisch een overzicht gegeven van het "Principe van de behandeling van leukemie".

#### **Deel A.**

**Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren, die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking en voor bestudering van veranderingen in het botmetabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED]**

1. Genetische en fenotypische karakterisering van hematologische tumoren zowel vóór als nadat deze [REDACTED] in muizen zijn uitgegroeid
2. Onderzoek naar de rol van stroma in de hematopoietische niche m.b.t. veranderingen in het botmetabolisme en stroma functie, gekenmerkt door veranderde gen-expressie, -receptorexpressie, -cytokine secretie, inductie van tumorvorming, door de specifieke interacties tussen (normale) stromale cellen/endotheel cellen en de hematologische tumorcellen of tussen maligne stromale cellen met normale hematopoietische stamcellen (HSC).

#### **Deel B.**

**Therapie ontwikkeling in het [REDACTED] Chemotherapie en/of immuno-chemo combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"**

1. Het uittesten van nieuwe cytostatica die zich nog in het preklinische traject bevinden en die als "veelbelovend" te voorschijn zijn komen in grootschalige in vitro screenings\* programma's, en dit in relatie tot het voorkómen van het optreden van "clonale getijden". (\*in vitro screening is bedoeld om dié middelen te identificeren waarvan verwacht mag worden dat ze in in vivo anti-tumor effect zullen hebben maar dat moet dan wel in geschikte diermodellen experimenteel worden vastgesteld. In dit kader hebben wij bijvoorbeeld in vitro een eerste screen gedaan met 180.000 compounds waarvan er, na een tweede in vitro selectieprocedure, slechts tientallen kandidaten zijn overgebleven die voor in vivo testen in aanmerking komen).
2. het uittesten van de toegevoegde waarde van immunotherapie met monoclonale antilichamen als monotherapie of in combinatie met chemotherapie en/of cellulaire immuuntherapie, (ook hier geldt dat er een in vitro screening traject aan vooraf gaat om de meest veelbelovend antilichamen te identificeren die in aanmerking komen voor verdere in vivo experimenten).
3. onderzoek met nieuwe vormen van cellulaire immuuntherapie gebaseerd op CAR-T-cellen, CTL of NK-cellen of andere immuuncompetente cellen of combinaties, met of zonder chemotherapie en/of immuunmodulatie.

Ad A1. Genetische en fenotypische karakterisering van de hematologische tumoren en het hematopoietische stroma. De hematologische maligniteiten worden historisch ingedeeld aan de hand van morfologisch kenmerken (FAB classificatie). Het is in de laatste jaren echter duidelijk geworden dat er op basis van specifieke veranderingen in het DNA (chromosomale translocaties) een betere opsplitsing gemaakt kan worden waardoor er binnen elk ziektebeeld (AML, MM, MDS, MF) meerder subtypen kunnen worden onderscheiden, ieder met hun eigen prognostisch profiel en waarop keuzes voor bepaalde behandelingen op zouden kunnen worden gebaseerd. Wij willen onderzoeken of er bij een bepaald genetisch of fenotypische profiel een correlatie bestaat tussen de specifieke genetische afwijkingen en het patroon van groei en het ontwikkelen van (chemo-en of immuno-) resistentie.

Ad A2. Bestudering van de rol van het hematopoietische stroma in de [REDACTED] bij de tumorgroei, een verstoord botmetabolisme en therapie-resistentie.

Uit onze lopende onderzoeken blijkt dat er ook in de hematopoietische microomgeving (in het beenmerg) typerende veranderingen optreden als gevolg van specifieke interacties tussen het stroma van het (tumor)beenmerg en het type tumor dat daarin aanwezig is. Dit geldt vooral voor de genetisch verschillende subtypen van het multipel myeloom, maar ook voor myelodysplasie en myelofibrose; voor acute leukemie is dat vooralsnog niet zo duidelijk. Bij myeloma leidt de interactie met het stroma ook tot een negatief effect op de botgroei met blijvende schade aan het herstelvermogen van het botweefsel, ook na succesvolle therapie. Ook voor dit type onderzoek blijkt het gehumaniseerde muismodel geschikt want we hebben eerder gevonden dat, nadat er in vivo contact is geweest tussen de tumorcellen en stroma, dat er typerende veranderingen in zijn opgetreden. Om te kunnen onderzoeken of deze tumorspecifieke veranderingen de ontsporing van stroma of tumorcel kunnen verklaren, worden dezelfde afwijkingen in normale stromale cellen aangebracht en vervolgens wordt er in het [REDACTED] onderzocht wat voor gevolgen dit heeft voor tumorgroei. Dat is één van de manieren om inzicht te krijgen in de pathofysiologie van deze vormen van beenmergkanker en om nieuwe "targets" voor therapie te vinden.

## **Ad B. Therapie ontwikkeling: chemotherapie en immunotherapie als monotherapie of als combinatietherapie in relatie tot resistentie, klonale evolutie/clonale "getijden"**

Recent zijn er technologieën ontwikkeld die het mogelijk maken om ook kleine subpopulaties tumorcellen in het leukemische beenmerg op te sporen (i.c. whole genome/exome sequencing en flow cytometrie) waarmee bewezen zijn gevonden voor de gelijktijdige aanwezigheid van meerdere genetische en/of fenotypisch verschillende subpopulaties tumorcellen in het beenmerg van patiënten. Deze worden ook wel met "klonen" aangeduid en zijn mogelijk geëvolueerd vanuit die éne ooit ontspoorde cel, door bijvoorbeeld genomische instabiliteit, door invloeden in de hematopoietische microomgeving of ze zijn ontstaan door therapie-geïnduceerde DNA veranderingen waardoor de tumorcellen resistentie hebben ontwikkeld. Wat in de kliniek wordt waargenomen is dat er in de tijd schommelingen zijn in de relatieve samenstelling van de subpopulaties waarbij er klonen opkomen en soms tijdelijk weer verdwijnen om door andere subklonen vervangen te worden afhankelijk van het type (chemo) therapie die wordt toegediend. Dit verschijnsel wordt wel "clonal tides" ("klonale getijden") genoemd en leidt uiteindelijk tot meerdere en steeds meer resistentie tumorcelopulaties. Eén van de doelstellingen van dit project is het onderzoeken van de relatie tussen de klonale getijden en de genetisch kenmerken van de subpopulaties en te onderzoeken wat er gebeurt als er een specifiek daarop gerichte combinatietherapie wordt toegepast. Deze kan bestaan uit combinatie chemotherapie, immunotherapie met monoclonale antilichamen (mAbs) of met cellulaire immunotherapie of combinaties hiervan.

### **Een aantal voorbeelden van specifieke vragen die we in het onderzoeksproject willen gaan onderzoeken, en die deels via dierpexperimenten bestudeerd gaan worden zijn:**

- hoe heterogeen is de tumorcelpopulatie in de diagnose monsters, dus voorafgaande aan de therapie, m.a.w. hoeveel subgroepen (klonen) zijn er aanwezig en in welke verhouding en welke zijn transplanteerbaar in het muizenmodel?
  - hoe onderscheiden de verschillende klonen zich ten opzichte van elkaar, i.e., wat is hun genetische en fenotypische profiel?
  - hoe verandert deze onder invloed van de toegediende chemotherapie (resultierend in de "klonale getijden"); m.a.w. in hoeverre waren de resistente klonen reeds aanwezig bij aanvang van de therapie (dus in het uitgangsmateriaal), in hoeverre zijn ze door de gegeven behandeling uitgeselecteerd,
  - zijn er overeenkomsten tussen patiënten? m.a.w. komen bepaalde genetische veranderingen bij meerdere patiënten binnen een subgroep voor?
  - zijn deze afwijkingen te koppelen met het resistentie profiel en de toegepaste therapie?
  - kunnen we, uiteindelijk, op grond van reeds bij diagnose vastgestelde afwijkingen in de tumorcellen, al bij aanvang van de therapie een betere keuze maken m.b.t. het "optimale" medicijn voor de betreffende patiënt? Ook wel aangeduid met "personalized treatment"?
  - bij het onderdeel immunotherapie zullen niet alleen nieuw ontwikkelde monoclonale antilichamen die tegen bekende of nieuw gevonden tumorcel targets gericht zijn worden getest, maar ook T cellen met d.m.v. biotechnologie geconstrueerde chimere antigen receptoren (CAR-T [redacted])
- [redacted]
- De nieuwe behandelingsstrategieën die in dit project bestudeert worden voor de behandeling van patiënten met leukemie, myeloom en aanverwante tumoren, verkeren op dit moment nog in het ontwikkelingsstadium. De condities waaronder ze het beste kunnen worden toegepast zijn nog lang niet uitgekristalliseerd. Verder preklinisch onderzoek is noodzakelijk om de juiste keuzes te kunnen maken bij de vertaling naar de behandeling van de patiënt. In dat beslistraject spelen de uitkomsten de dierexperimenten die in dit project uitgevoerd gaan worden, een mede bepalende rol.

### **Haalbaarheid van het project.**

- De instelling waar dit onderzoek plaatsvindt heeft een groot en gevarieerd leukemiepatiënten aanbod (zowel AML, MM, MDS en MF) en speelt een zeer actieve, soms centrale rol bij nationale en internationale onderzoeksprogramma's op dit terrein. Dit geeft de garantie dat er voldoende klinisch materiaal beschikbaar is, om het onderzoek te kunnen uitvoeren. Verder is er binnen de afdeling hematologie van het VUMC ook de structuur aanwezig om de onderzoeksresultaten direct naar klinische fase I/II studies te vertalen.
- De doelstellingen, zoals die in dit project zijn geformuleerd, zijn niet nieuw, want het project is een voortzetting van een al geruime tijd lopende onderzoekslijn die sinds 2009 op basis van het [redacted] model steeds verder wordt uitgebouwd. Er is daarom uitgebreide ervaring met het uitvoeren van het type experimenten in het [redacted] model, zoals die in dit project worden voorgesteld.
- Met betrekking tot doelstelling (A1), de "Karakterisatie en biobanking van verschillende typen tumoren" ...is onze ervaring dat het "engraftment succes percentage" in het [redacted] met >95% voor acute leukemie en met 60-70% voor multipel myeloom, zeer hoog is, waardoor de meeste experimenten met succes afgerond zullen kunnen worden. (Overigens geeft het "niet aanslaan" van een tumor ook informatie over de aard van het betreffende type leukemie). Ook is gebleken dat de leukemie stamcel zich in de humane niche kan vestigen en delen en ook in aantal toeneemt maar daarnaast ook uitrijpt tot mature leukemiecellen (zoals dat bij patiënten ook gebeurt), maar ook is gebleken dat in de muizenweefsels alleen de meer mature leukemiecel zich blijkt te kunnen handhaven. Voor de fenotypische analyse (celoppervlakte merkers) van de monsters zijn er geen problemen aangezien het laboratorium waar het onderzoek plaatsvindt [redacted] Voor de genetische

analyse is er in huis een faciliteit beschikbaar en daarnaast hebben wij op dit terrein internationale samenwerkingen met gerenomeerde instituten.

- Doelstelling (A2), bestudering van de veranderingen in het bot metabolisme en in de stromale component van de [REDACTED] is voor ons een standaardprocedure. Het genetisch modificeren van stromale cellen en tumorcellen en het moduleren van genexpressie wordt al met succes door ons toegepast.
- Doelstelling (B1), via doorlopende internationale samenwerkingsprojecten komen er voldoende stoffen (cytostatica) beschikbaar die in het hu [REDACTED] model op resistente patiënten monsters of bepaalde cellijnen getest kunnen worden. Op dit terrein is er structurele samenwerking tussen farmaceutische industrie en de hematologische kliniek en de preklinisch onderzoekers; daardoor is een goede toegang tot nieuwe antilichamen/cytostatica. Binnen de onderzoeksgroep is expertise in [REDACTED]
- [REDACTED]
- Door de nauwe betrokkenheid van klinisch hematologen en de op translationeel onderzoek gerichte instelling van de projectgroep is de translatie van nieuwe kennis naar klinische phase I/II studies gegarandeerd.
- De projectgroep ( op dit moment bestaande uit [REDACTED], 3 onafhankelijke maar goed samenwerkend groepsleiders (PI's), 4 PhD studenten, 6 analisten (voor een deel ook biotechnisch geschoold) beschikt over voldoende [REDACTED] om de voorgestelde experimenten binnen dit project uit te kunnen voeren.

• De [REDACTED]

### 3.3 Belang

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

#### **Wetenschappelijk belang:**

De resultaten van het onderzoek zullen in belangrijke mate kunnen bijdragen aan een verbeterd inzicht in de ziekteprocessen zoals die zich bij de verschillende hematologische tumoren voordoen (AML, MM, MF, MDS) en waardoor ook duidelijk wordt waarop nieuwe therapieën het beste gericht kunnen worden. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen een belangrijke bijdrage gaan leveren aan de introductie van deze nieuwe vormen van therapie zoals: (i) [REDACTED]

#### **Maatschappelijk belang:**

Per jaar worden alleen al in Nederland circa 1000 nieuwe patiënten diagnostiseerd met leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie of myelofibroze. De kans op genezing is voor AML patiënten ongeveer 50%, van de myeloom patiënten  $\pm$  10%. De laatste jaren zijn er wel nieuwe middelen ontwikkeld die enige verlenging van de overlevingsduur hebben gebracht, maar het percentage genezen patiënten neemt nauwelijks toe. Alle patiënten krijgen gedurende een aantal achtereenvolgende jaren een steeds intensievere chemotherapie behandeling (soms nog aangevuld met een risicovolle stamcel transplantatie) die desondanks voor de meeste patiënten uiteindelijk resulteert

in therapie resistentie. Het is onze stellige overtuiging dat het soort onderzoek zoals wij dat in dit project willen ondernemen een belangrijk bijdrage leveren om de patiënten in een zo vroeg mogelijk stadium de meest effectieve (en minst belastende) therapie te kunnen bieden. Doordat er een nauwe samenwerking bestaat tussen de kliniek (hematologen) en prekliniek (onderzoekers) op dit project kunnen de resultaten van het onderzoek direct vertaald worden in phase I-II studies. Hierdoor kunnen de nieuw verkregen inzichten direct bij patiënten worden toegepast om daarmee hun kansen op verdere verlenging van de remissieduur en op uiteindelijke genezing te doen toenemen.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene opzet van het project is geënt op de vraagstellingen die er bestaan bij de behandeling van patiënten met hematologische tumoren (AML, MM, MDS, MF). Daarbij wordt een heel traject doorlopen, vanaf de diagnose, eerste behandeling met remissie-inductie chemotherapie, soms gevolgd door een (allogene) stamceltransplantatie met een aanvullende immuuntherapie (donor lymfocyten infusie), en in geval van een relapse aanvullende chemotherapie (zie het bijgevoegde schematische overzicht "Principe van de behandeling van hematologische tumoren".) Door allerlei ontwikkelingen komt er een steeds groter aanbod van experimentele chemotherapeutica, immunotherapie met antilichamen en/of cellulaire immunotherapie. Bij welke van deze therapiën de patiënt het meeste baat zal hebben is onduidelijk omdat de meeste van deze therapiën zich nog in het ontwikkelingsstadium bevinden. De condities waaronder ze het beste kunnen worden toegepast zijn nog lang niet uitgekristalliseerd.

In dit project proberen we meer duidelijkheid te krijgen hoe effectief de nieuwe therapiën zouden kunnen zijn en hoe ze het beste gecombineerd kunnen worden toegepast. De specifieke vraagstelling wordt zodanig geformuleerd dat deze in het door ons hiervoor ontwikkelde gehumaniseerde diermodel getest kan worden. De uitkomsten van het onderzoek worden dan vertaald in een aanpassing van klinische behandelprotocollen.

De strategie in dit project is om tumorcellen van patiënten te laten uitgroeien in een gehumaniseerd omgeving in de muis waarbij ze getest worden terwijl zich bevinden in hun natuurlijke omgeving, maar dan in humane omgeving die in de muis wordt gecreëerd.

Het diagnose beenmergmongsters wordt onderzocht nadat de tumorcellen in de gehumaniseerde [REDACTED] zijn uitgroeid; de stromafunctie van het patientenbeenmerg kan worden getest, gemanipuleerd en de effecten op de groei bestudeerd.

Door in de [REDACTED] de tumorcellen te laten uitgroeien tot tumoren kunnen ze getest worden op hun gevoeligheid voor chemo en immunotherapie.

[REDACTED] in de praktijk werkt kan de volgende, eerder uitgevoerde studie, als voorbeeld dienen. Bij een klinische fase I/II studie van multipel myeloom patiënten met een antilichaam tegen CD38 (dat hoog tot expressie komt op MM cellen), werd na aanvankelijk een prima response, waargenomen dat de in de patient resterende MM cellen nog maar een laag niveau van CD38 expressie vertoonden; waardoor deze tumorcellen blijkbaar aan de therapie konden ontsnappen. Nu hadden we op basis van in vitro studies aanwijzingen dat toevoeging van het middel ATRA (dat bij acute promyelocyten leukemie zeer goed werkt) het niveau van CD38 expressie op de MM cellen weer omhoog bracht en in vitro weer gevoelig voor anti CD38. Maar om dit zonder meer aan MM patiënten toe te dienen werd niet verantwoord geacht; het zou ook de proliferatie van MM cellen kunnen stimuleren. Daarom werd in [REDACTED] muizen met daarin patiënt MM cellen getest of het combineren van antiCD38 met ATRA een verhoogde response zou kunnen geven op patiënten MM cellen terwijl deze zich in de context van een humane beenmergomgeving (in de [REDACTED] muis) bevonden. En inderdaad, de combinatie resulteerde in een veel sterkere afname van de tumoren ten opzichte van de controle groepen. Mede op basis van deze studie is er intussen een fase - I studieprotocol ontwikkeld met de ATRA-anti CD38 combinatie, dat binnenkort in de kliniek van start zal gaan. In het huidige project wordt een soortgelijke opzet gekozen om nieuwe chemotherapeutica, nieuwe monoclonale antilichaamtherapie en nieuwe cellulaire therapiën, zoals bijvoorbeeld met CAR T cellen en NK cellen, in het preklinische traject bij de verschillende vormen van hematologische tumoren op hun effectiviteit te onderzoeken en vervolgens, bij bewezen potentie, [REDACTED].

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

##### Onderdelen van de experimenten in het project op hoofdlijnen:

###### Deel A:

- Het verkrijgen van inzicht in genetische en fenotypische kenmerken van de tumorcelpopulatie om op basis daarvan patient-specifieke ("personalized ") behandeling te kunnen gaan ontwikkelen
- Het verkrijgen van inzicht van de invloed van een veranderde/dysfunctionele stromale omgeving m.b.t. genexpressie, botmetabolisme en therapie-resistentie en wederzijdse beïnvloeding/interactie tussen stroma en de tumorcellen.

Voor deze experimenten worden dierproef type 1 uitgevoerd.

Titel : "Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED] " (B)"

**Ad A1:**

Stap 1: het genereren van zogenaamde [REDACTED]

[REDACTED]. Om de groei van de tumorcellen te "beïnvloeden" worden soms ook genetisch aangepaste stromacellen uitgezaaid. Stap 2: in deze [REDACTED] worden tumorcellen geïnjecteerd die uitgroeien tot tumoren, dit duurt 4-max 12 maanden en deze worden regelmatig gemonitord (caliper metingen). Tumoren en stroma worden na euthanasie geïsoleerd en onderzocht. Kenmerk van deze dierproef: ongestoorde uitgroei in [REDACTED] muizen, analyse post mortum. Stap 3 (in een deel van de experimenten). Wanneer de tumorcellen zijn gemarkeerd met luciferase of fluorescerende eiwitten, wordt met bioluminescentie imaging (onder narcose) de groei van de tumor gevolgd.

**Ad A2:**

Stap 1: stromale stamcellen, die zijn opgekweekt uit normaal donorbeenmerg of uit tumorbeenmerg, worden op [REDACTED]. Na circa 2-4 maanden worden de [REDACTED] geïsoleerd en het stroma wordt geanalyseerd voor genexpressie en voor botvorming. Bij een aantal experimenten zullen biologisch actieve stoffen (compounds) worden toegediend waarvan verondersteld wordt (op grond van in vitro screening studies) dat deze het "defect" in botaanmaak kunnen herstellen/beïnvloeden. Kenmerk van deze dierproef: voor een deel ongestoorde uitgroei in [REDACTED], analyse post-mortum. De te testen stoffen zijn afkomstig uit in vitro screenings programma's waarbij uit een groot aantal "veelbelovende" compounds de meest kansrijke voor in vivo botgroei stimulatie, moeten worden geselecteerd. Deze proefopzet wordt ook gebruikt indien er MDS of MF patiënt stroma wordt onderzocht in het [REDACTED]. In dat geval worden er óf maligne óf normale stamcellen (na minimaal 6-8 weken) in de [REDACTED] geïnjecteerd en geobserveerd voor uitgroei zoals beschreven is bij ad A1.

**Deel B****Ad B1,2,3.**

Stap 1 [REDACTED]

[REDACTED] Voor experimenten waarbij stroma – gerelateerde chemo-of immuno resistentie wordt onderzocht, worden genetisch veranderde stromale cellen gebruikt voor het creëren van een aangepaste "niche".

Stap 2: uit het biobank bestand worden de tumorcellen van specifieke patiënten geselecteerd die op basis van gedefinieerde genetische/fenotypische analyse in aanmerking komen om met therapie "x" behandeld te worden, en in de [REDACTED] geïnjecteerd. Daarin groeien ze uit tot tumoren. (Nb. voor bepaalde experimenten kunnen de cellen eerst met merker genen genetisch worden gemarkeerd (met genen die coderen voor luciferase en/of fluorescerende eiwitten) ten behoeve van "real life" bioluminescentie/fluorescentie imaging/of 2-photon imaging (onder narcose) om naast de tumorgroei, eventueel het hominggedrag van tumorcellen of van immuun-effectorcellen en de effecten die de behandeling daarop heeft, te kunnen monitoren.

Stap 3: De muizen met tumoren worden in vivo blootgesteld aan therapie met middel "x"; "x" kan zowel chemotherapie óf antilichaam- óf immunotherapie óf een combinatie van deze betreffen.

De analyse vooraf én na therapie kan inzicht geven in de relatie tussen genetische/fenotypische opmaak van de tumorcellen en de gevoeligheid voor een bepaalde therapie.

---

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

De experimenten die in dit project worden uitgevoerd vertonen een sterke onderlinge samenhang. Dit komt doordat wij het hele traject van het ontstaan van leukemie, myeloom, myelodysplasie en myelofibrose én de behandeling van deze tumoren, én het als gevolg daarvan het ontstaan van resistentie én het doorbreken daarvan met onze ideeën over specifieke, patiënt-gerichte (chemo-immunotherapie) in een [REDACTED] willen reproduceren (zie het bijvoegde schema behandeling leukemie).

Dat begint met het willen begrijpen waarom de tumoren ontstaan, dus het identificeren van de genetische/moleculair



biologische oorzaken die hieraan te grondslag liggen. Dit onderzoeken we bij onderdeel A1, waarbij van patiënten afkomstige tumorcellen, zowel vóór als na uitgroei in het humane [REDACTED] model, worden geanalyseerd (gedetailleerde genetische en fenotypische analyse), gecategoriseerd en in een (stikstof) biobank opgeslagen. In onderdeel A2 worden de kenmerkende veranderingen in de micro-omgeving die zijn opgetreden (i.c. de [REDACTED] en botmetabolisme veranderingen) in kaart gebracht. Door experimenten uit te voeren met een genetische aangepaste micro-omgeving, waarin de gevonden veranderingen selectief zijn ingebracht kan in het [REDACTED] model onderzocht worden wat de specifieke rol is van een veranderde micro-omgeving als drijvende kracht in tumorvorming en tumorgroei.

Dan volgt bij onderdeel B onderzoek om innovatieve therapie (chemo-immuno) te ontwikkelen op basis van de verkregen informatie bij A1 en A2, waarbij de focus komt te liggen op resistentie (zoals die in de patient is ontstaan en in de muis gereproduceerd door het toedienen van vergelijkbare therapie als die de patient heeft gekregen). Dat begint met vanuit de biobank specifiek resistente patiënten monsters te selecteren om daarmee óf experimenten uit te voeren met een nieuwe compound (cytostaticum) (**chemotherapie**) die deze resistentie zouden kunnen doorbreken, óf voor het uittesten van de specifieke [REDACTED]

Mijlpalen in dit onderzoek zijn:

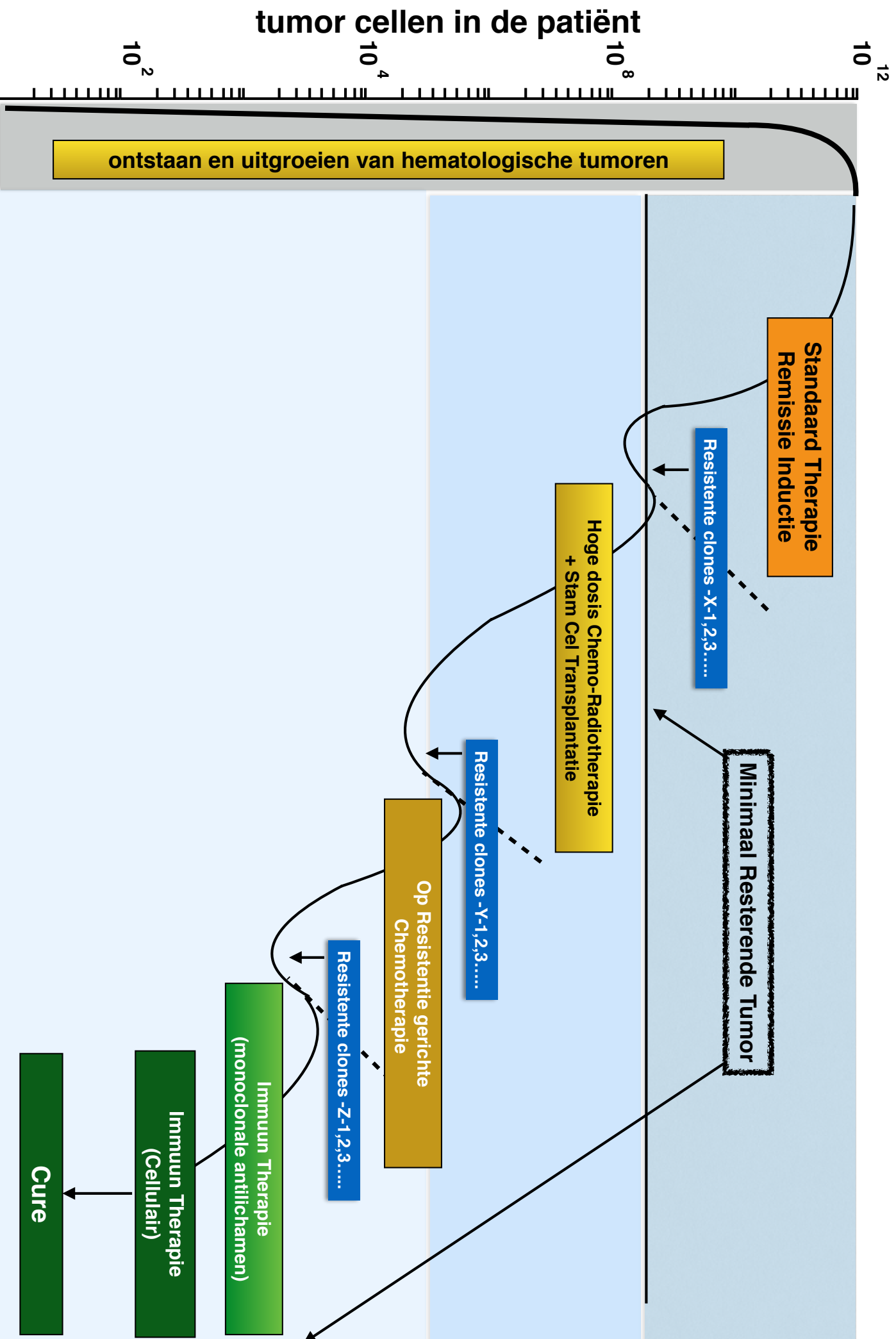
- het genereren van een substantiële biobank met volledig gekarakteriseerde en gevalideerde patiënten tumorcellen, die in het [REDACTED] zijn gegroeid en geëxpandeerd, voor alle denkbare aanvullende onderzoeken en experimenten
- het begrijpen hoe het verlies van de functie of een overactiviteit van een bepaalde gen of genproduct (in de tumorcellen) gekoppeld kan worden aan een bepaald resistentie patroon;
- het identificeren van de oorzaken (genetische verandering) van het dysfunctioneren van de stromale component in de [REDACTED]" (zowel in de tumorcel als/of in stromale cellen);
- het identificeren van een (afwijkend) genetisch profiel dat gekoppeld kan worden aan een specifieke therapie-resistentie en het kunnen doorbreken daarvan met een nieuwe compound, of een nieuw monoclonaal antilichaam, of nieuwe "typen" immuuncompetente cellen, of combinaties van deze;
- het (bijdragen) aan implementatie van een nieuwe behandeling in de klinische praktijk op basis van de resultaten van experimenten in het gehumaniseerd muizenmodel

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

| Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het botmetabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED] |
| 2          | Therapie ontwikkeling in het [REDACTED] (B)<br>Chemotherapie en/of immuno-chemo combinatietherapie in relatie tot resistentie, clonale evolutie/"clonale getijden"  |
| 3          |   |
| 4          |   |
| 5          |   |
| 6          |   |
| 7          |   |
| 8          |   |
| 9          |   |
| 10         |   |

# Principe van de behandeling van hematologische tumoren (leukemie etc)

(eerst tumorload reductie, daarna op Minimaal Resterende Tumor gerichte chemo-immunotherapie)



**Projectaanvraag:**

Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [REDACTED]  
[REDACTED] t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [REDACTED] VUMC

Overzicht aantal dieren per dierproef met bijbehorend ongerief.

| Onderdeel/dierproef   | Diersoort                    | Aantal dieren*           | Mate van ongerief                |
|---|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| <b>Dierproef 1</b><br>Ten behoeve van karakterisering en biobanking van hematologische tumoren; veranderingen in het bot metabolisme en onderzoek van stromafunctie in de (maligne) beenmerg niche<br>Fok van dieren voor dierproef 1 | muis<br>muis<br>muis<br>muis | 750<br>300<br>600<br>450 | matig<br>matig<br>matig<br>licht |
| <b>Dierproef 2</b><br>Ontwikkeling van chemo-immuno-combinatie therapie in het hu-<br>[REDACTED] model in relatie tot resistentie.<br>Fok van dieren voor dierproef 2   | muis<br>muis                 | 2000<br>550              | matig<br>licht                   |
| Totaal aantal dieren gehele project in 5 jaar   | muis                         | 4650                     |                                  |

\*Totaal aantal dieren voor de looptijd van het project van 5 jaar

# DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
2. Titel van het project: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
3. Titel van de NTS: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC: Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: 25-06-2015
  - aanvraag compleet: 25-06-2015
  - in vergadering besproken: 14-07-2015
  - anderszins behandeld: n.v.t.
  - termijnonderbreking(en) van / tot: n.v.t.
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
  - aanpassing aanvraag: 30-07-2015
  - advies aan CCD: 03-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 21-07-2015
  - Strekking van de vraag / vragen: De DEC stelt enkele kleine tekstuele verduidelijkingen voor. De keuze voor het gebruik van een specifiek geslacht heeft een motivatie. Tot slot dienen de voor de fok in te zetten aantallen dieren met een genetisch gemodificeerde achtergrond in de aanvraag te worden vermeld.
  - Datum antwoord: 30-07-2015
  - Strekking van het (de) antwoord(en): De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd.
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja
9. 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. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t. (geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project)

## C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
  - ✓ uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
  - wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De doelstelling is helder omschreven. De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:

Het wetenschappelijk belang: meer inzicht verkrijgen in de ziekteprocessen van verschillende soorten hematologische tumoren (leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie of myelofibrose) en het ontwikkelen en testen van nieuwe behandelingsmethoden (chemo-therapeutica, antilichamen en cellulaire immuuntherapieën).

Het maatschappelijk belang: Het onderzoek kan een belangrijke bijdrage leveren aan het verbeteren van behandelingsmethoden en het ontwikkelen van nieuwe therapieën, zodat patiënten in een zo vroeg mogelijk stadium van de ziekte de meest effectieve en minst belastende vorm van therapie kunnen krijgen

Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang wordt door de DEC ingeschat als substantieel. Per jaar worden in Nederland circa 1000 nieuwe patiënten gediagnostiseerd met hematologische tumoren (leukemie, multipel myeloom, myelodysplasie of myelofibrose). Met de voorhanden zijnde behandelingsmethoden kan een groot deel van deze patiënten niet adequaat worden geholpen. Er is dringend behoefte aan betere therapieën. Het maatschappelijke belang van dit onderzoek is om die reden groot.

4. 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.

Het proefdieronderzoek vindt plaats in nauwe samenwerking met de kliniek. Hierdoor is de beschikbaarheid van patiënten materiaal voor het onderzoek gegarandeerd. De selectie van te testen therapeutica vindt in nauwe samenwerking met onder meer de kliniek en farmaceutische partners plaats.

Met de techniek waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd bestaat ruime ervaring. De slagingskans van experimenten is zeer hoog. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren.

Binnen de afdeling is de structuur aanwezig om de onderzoeksresultaten naar klinische fase I/II studies te vertalen. De nieuw verkregen inzichten kunnen op termijn bij patiënten worden toegepast, wat de kansen op remissie en op uiteindelijke genezing doet toenemen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat binnen de looptijd van het project nieuwe en/of aanvullende inzichten zullen worden verkregen die uiteindelijk klinisch toepasbaar blijken te zijn. Tegelijkertijd moet worden verwacht dat de onderzoekslijn als zodanig langer dan vijf jaar zal doorlopen, omdat niet binnen deze termijn optimale en volledig effectieve behandelingen voor alle soorten hematologische tumoren in alle patiënten zullen kunnen worden ontwikkeld.

5. Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het verwachte ongerief: matig, als gevolg van het opzetten van de diermodellen (injectie met tumorcellen) en het toedienen van medicijnen, waaronder chemotherapie of immunotherapie. Ernstig ongerief wordt niet verwacht.
7. Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de vervanging van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.

Het gebruik van proefdieren is noodzakelijk, omdat uit eerder onderzoek is gebleken dat het onmogelijk is om leukemie/myeloom patiëntmateriaal in vitro te laten uitgroeien met behoud van de voor het onderzoek essentiële tumorkenmerken.

De keuze voor het gebruik van muizen is naar het oordeel van de DEC gerechtvaardigd. Er wordt gebruikt gemaakt van muizen met een verzwakt immuunsysteem, omdat alleen in deze dieren tumorcellen van patiënten kunnen uitgroeien zonder een afstotingsreactie op te roepen.

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

Het maximale aantal dierproeven is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 4650 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.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd.

Door de opzet van de experimenten blijft tumor uitgroei gelokaliseerd in de XXXXXXXXXX

████████████████████ Dit veroorzaakt minder ongerief dan andere leukemie-diermodellen.

Tijdens de dierproeven zal waar nodig pijnstilling of verdoving worden toegepast. Richtlijnen voor zorgvuldig onderzoek, in dit geval de Code of Practice voor dierproeven in het kankeronderzoek, worden gevolgd. Mochten onvoorziene complicaties optreden die meer dan matig ongerief veroorzaken dan wordt het experiment onmiddellijk beëindigd. Alle dierproeven worden uitgevoerd door bekwaam personeel.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. 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

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 4650 muizen en het daarmee samenhangende maximale matige ongerief bij de dieren en hun overlijden gerechtvaardigd.

Het verwachte resultaat, in het kader van de bestrijding van levensbedreigende en zwaar belastende ziekten, weegt moreel gezien in voldoende mate op tegen de schade bij dieren in de vorm van lijden, pijn en angst. 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 wetenschappelijke onderzoek in dit project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van een beter wetenschappelijk inzicht in de ziekteprocessen van verschillende hematologische tumoren en het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere, meer effectieve en minder belastende behandelingsmethoden voor patiënten.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de doelstellingen worden behaald. De onderzoeksgroep beschikt over ruime ervaring op het gebied van de te gebruiken methoden en werkt nauw samen met klinici. De groep heeft tijdens eerder onderzoek veel kennis en ervaring opgedaan met de voorgestelde typen dierproeven. In combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dit dat de groep goed gekwalificeerd en geoutilleerd is voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 4650 muizen en het daarbij verwachte maximale matige ongerief.

## E. Advies

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.





Centrale Commissie Dierproeven

11.

06 AUG 2015

06 AUG 2015

## Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Gegevens aanvrager

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

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Naam van de portefeuillehouder | [REDACTED] |
| KvK-nummer                     | 53815211   |
| NVWA deelnemernummer           | 11400      |

### 2 Gegevens gemachtigde

2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.

|   |            |
|---|------------|
| <input type="checkbox"/> KvK-nummer     | [REDACTED] |
| <input checked="" type="checkbox"/> BSN | [REDACTED] |

2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

|                    |                            |   |
|--------------------|----------------------------|---|
| Naam gemachtigde   | [REDACTED]                 | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Adres of postbus   | van der Boechhorststraat 1 |   |
| Postcode en Plaats | 1081 BT Amsterdam          |   |

### 3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?  
 Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.  
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?  
 Ja > Ga door naar vraag 4  
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?  
 Een projectvergunning aanvragen  
 Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen  
 Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning  
 Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.  
 Alle bovenstaande opties

### 4 Ondertekening

- 4.1 Ondertekenen het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Naam gemachtigde

Datum

3 0 - 0 7 - 2 0 1 5

Handtekening  
portefeuillehouder  
van de instelling

Handtekening  
gemachtigde



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VU Medisch Centrum  
p/a [REDACTED]  
van der Boehorststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002015201  
**Bijlagen**  
2

Datum 03-08-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 augustus 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002015201. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400  
Naam instelling of organisatie: VU Medisch Centrum  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 53815211  
Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117  
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM  
IBAN: [REDACTED]  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 11400  
BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Adres: van der Boehhorststraat 1  
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM

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
- Alle bovenstaande opties

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2015  
Geplande einddatum: 31 augustus 2020  
Titel project: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)  
Titel niet-technische samenvatting: Pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose)  
Naam DEC: DEC-VU-VUMC  
Postadres DEC: Van der Boehhorststraat1, Transistorium, kamer [REDACTED], 1081 BT Amsterdam / The Netherlands  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Amsterdam  
Datum: 3 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VU Medisch Centrum  
p/a [REDACTED]  
van der Boeฮอร์ststraat 1  
1081 BT AMSTERDAM  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002015201  
**Bijlagen**  
2

Datum 03-08-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 3 augustus 2015  
Vervaldatum: 2 september 2015  
Factuurnummer: 201570201

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD114002015201 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum VUMC  
t.a.v. [REDACTED]  
De Boelelaan 1117  
1080 HV Amsterdam  
Nederland

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD114002015201

**Uw referentie**

Datum 23 september 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED],

Op 03 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose). Met aanvraagnummer AVD114002015201. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). De commissie ziet uw aanvraag als 2 afzonderlijke projecten te weten: deel A bestaand uit subdoel A1 en A2, bijlage dierproeven 3.4.4.1 en deel B, bestaand uit subdoel B1, B2 en B3 bijlage dierproeven 3.4.4.2. De huidige projectaanvraag behandelt een project met 2 verschillende doelstellingen die elk een eigenstandige beoordeling behoeven. Hieraan liggen artikel 10a lid 7 en art. 10a2 van de wet ten grondslag.

Deze vergunning betreft Deel A van uw projectaanvraag, dit betreft het deel bijlage dierproeven 3.4.4.1. Hierbij geldt de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Deze algemene voorwaarde wordt gesteld bij vergunningen met een looptijd van 5 jaar. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit artikel 10 lid 1a van de wet.

U kunt met deel A van uw project pathofysiologie en therapie ontwikkeling voor hematologische maligniteiten (leukemie, myeloom, myelodysplasie, myelofibrose) starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 31 augustus 2020.

De commissie verzoekt u voor deel B van uw project een aparte aanvraag in te dienen. In deze separate aanvraag verzoekt de commissie u aandacht te besteden aan onderbouwing van de selectie criteria op basis waarvan therapeutica uit de in vitro selectie geschikt worden geacht voor in vivo toepassing.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit Amsterdam/ VU medisch centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Omdat er geen sprake is van een coherent project waarvan alle projectonderdelen nodig zijn om het gezamenlijke doel te behalen. Wij nemen dit advies van de

commissie niet geheel over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

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

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum VUMC Amsterdam  
Adres: De Boelelaan 1117  
Postcode en woonplaats: 1081 HV Amsterdam  
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 31 augustus 2020, voor het project met aanvraagnummer AVD114002015201, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit Amsterdam/ VU medisch centrum. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat de commissie in de aanvraag twee afzonderlijke projecten onderscheidt.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is UHD/ onderzoeker

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 6 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 augustus 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 augustus 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 3 augustus 2015;
  - d. Herziene versie van de NTS voor het vergunde deel van het project ontvangen op 22 september 2015.

### Dierproeven

| Naam dierproef  | Diersoort                    | Aantal dieren   | Ernst | Voorwaarden |
|---|------------------------------|---|-------|-------------|
| Pathofysiologie van humane primaire hematologisch tumoren die groeien in een [redacted] in muizen, t.b.v. karakterisering en biobanking (A1) en veranderingen in het bot metabolisme en de stromafunctie in de [redacted] | Muizen, vrouwelijk 8-9 weken | 2100/ 5 jaar waarvan n=1650 voor experimenten en n=450 voor fok | matig |             |

### Voorwaarden

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

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde

**Datum**

1 september 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD114002015201

dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

| Inventaris Wob-verzoek W16-04s |                              |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                              | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                     | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS 20151205</b>          |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier            |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                              | Projectvoorstel              |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 4                              | Bijlage dierproeven          |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 5                              | DEC-advies                   |                 |      | x      |       |                   | x      |        |      |
| 6                              | ontvangstbevestiging         |                 |      |        | x     |                   | x      |        |      |
| 7                              | Brief CCD 18-08-2015         |                 |      |        | x     |                   | x      |        |      |
| 8                              | Brief aanvrager 19-08-2015   |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 9                              | Advies aan CCD               |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 10                             | Beschikking en vergunning    |                 |      |        | x     |                   | x      |        |      |



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

|     |   |  |   |
|-----|---|--|---|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 11532   |
|     |   | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen           |   |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie                                     | UMC Utrecht   |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                |   |
|     |   | KvK-nummer   | 30244197  |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht                                  |
|     |   | Postbus  | 12007   |
|     |   | Postcode en plaats   | 3501AA Utrecht  |
|     |   | IBAN   | NL27INGB0000425267  |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | Universiteit Utrecht  |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  |   |
|     |   | Afdeling   |   |
|     |   | Telefoonnummer   |   |
|     |   | E-mailadres  |   |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  |   |
|     |   | Afdeling   |   |
|     |   | Telefoonnummer   |   |
|     |   | E-mailadres  |   |

- 1.6 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |
| Afdeling                    |  |
| Telefoonnummer              |  |
| E-mailadres                 |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- 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 - 2015  |
| Einddatum  | 30 - 6 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Nieuwe catheters voor echografie in het hart
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe catheters voor echografie in het hart
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

[Redacted]

Utrecht  
 09-08-2015

[Redacted]



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

## 3 Algemene projectbeschrijving

### 3.1 Achtergrond

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

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

Hartcatheterisatie voor structurele hart problemen en ablatie catheterisatie voor hartritme stoornissen (bv. boezem fibrilleren) worden op dit moment uitgevoerd met behulp van Röntgen visualisatie. Voor de veiligheid van arts en patient is er een trend naar toepassingen van niet-ioniserende beeldvorming zoals echografie. De laatste ontwikkelingen van "in-body" echografie, waarbij de transducers in de tip van de catheter worden geïntegreerd, reduceren het aantal Röntgen opnamen en daarmee de totale schadelijke stralingsdosis per interventie ten gunste van arts en patiënt.

Bestaande catheters voor intracardiale echografie zijn bestuurbaar in één richting, geven een zijdelings beeld en geven een twee-dimensionaal beeld. In deze studie zullen, in samenwerking met een industriële partner, catheters ontwikkeld worden met verbeterde eigenschappen wat betreft bestuurbaarheid en beeldvorming. Het belang voor de groep is echter wetenschappelijk en zal zich dus ook uiten in het publiceren van de data.

Dierexperimenten zijn essentieel in het verifiëren van positionering en stuurbaarheid van deze nieuw ontwikkelde catheters, als mede beeldkwaliteit van de transducers en visualisatie van anatomische kenmerken in het hart.

De catheters zullen vooraf op mechanische en beeldvormende kwaliteiten getest worden met behulp van bijvoorbeeld computer simulaties, fantoom modellen en ex vivo studies. Om een catheter te kunnen testen op stuurbaarheid en het juist kunnen positioneren in het hart, zal deze via een bloedvat ingebracht moeten worden en tot in de hart boezems/kamers worden gebracht. Weefsel/anatomische eigenschappen die hierbij van belang zijn, zijn niet na te bootsen in een model. Bij het visualiseren van hart kleppen en bloedstromingen spelen pompfunctie en hemodynamica een belangrijke rol.

De nieuw ontwikkelde intracardiale echografie catheters zullen in dieren worden getest met de volgende applicaties in gedachten; 1) interventionele structural heart defects, 2) interventionele ablatie procedures, 3) drie-dimensionale beeldvorming. De voorgestelde experimenten zijn nog geen onderdeel van een dossier opbouw voor toelating als medisch hulpmiddel, maar zijn exploratief en onderzoekend van karakter. Op basis van deze experimenten zullen de catheters verder verfijnd worden.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Ontwikkeling en verificatie van intracardiale echografie catheters met als doel de visualisatie van specifieke hart onderdelen voor, tijdens en na cardiale interventionele catheterisatie procedures.

Binnen de groep is veel ervaring met echografie voor medische toepassingen, catheter ontwikkeling en cardiologie. De studie zal uitgevoerd worden in varkens in samenwerking met ervaren cardiologen. Het eerste doel is de in vivo eigenschappen van de ontwikkelde catheters in kaart te brengen zoals de mechanische stabiliteit van de catheter welke belangrijk is voor een hoog beeldkwaliteit. Daarnaast is de mechanische stuurbaarheid van de catheter belangrijk voor de bereikbaarheid van de verschillende hartkamers met de catheter. Het tweede doel is het bepalen welke specifieke anatomische onderdelen

in het hart te visualiseren zijn (zoals de mitralisklep, linker atrium aanhangsel of de longvenen).

Afhankelijk van de ontwikkelingsstappen zullen de catheters op bepaalde eigenschappen getest worden om de volgende stap te kunnen maken. Dit betekent dat niet elke nieuwe versie van de catheter op alle defecten die worden aangebracht getest hoeven te worden. De keuze zal afhangen van het hoofdoogmerk van de laatste ontwikkelingsstap.

### 3.3 Belang

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

De ontwikkeling van nieuwe catheters voor intracardiale echografie waarbij uiteindelijk in de kliniek het volgende wordt bereikt:

- 1) Vermindering van het aantal Röntgen opnamen en daarmee de schadelijke stralingsdosis voor patiënt en arts.
- 2) Verminderen van het aantal Röntgen contrast injecties.
- 3) Verhogen van patiënt comfort door "in-body" echografie via veneuze of atriale toegang in plaats van echografie via de slokdarm.
- 4) Verminderen van herhaal interventies door artsen betere diagnostische beelden ter beschikking te stellen
- 5) Realiseren van nieuwe interventionele behandelingen op basis van nieuwe "in-body" beeldvormingstechniek.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voortraject: De catheters zullen vooraf op mechanische en beeldvormende kwaliteiten getest worden met behulp van simulaties, fantoom modellen en ex vivo studies. Op het moment dat de catheters voldoende presteren in deze modellen en de grenzen van deze modellen bereikt zijn mbt. de vertaalbaarheid naar de in vivo situatie, begint de fase waarin de in vivo testen begonnen worden.

Project: Testen van nieuw ontwikkelde intracardiale echografie catheters in varkens met nieuwe beeldvormende technologie (drie-dimensionaal) en gericht op het gebruik bij twee verschillende interventies: interventionele structural heart defect en interventionele ablatie procedures. De catheters zullen eerst getest worden op in vivo eigenschappen, en vervolgens getest worden op de mogelijkheid om anatomische onderdelen in het hart zichtbaar te maken. Dmv. de tijdens de proeven gewonnen informatie zullen de catheters telkens verder verbeterd en nadien opnieuw getest worden.

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

Type dierproef voor alle onderdelen: intracardiale echografie in varken.

Er is gekozen voor het varken aangezien de diameter van de bloedvaten in deze diersoort en de afmetingen van het varkenshart vergelijkbaar zijn met die van een mens.

Onderdeel 1: Testen van intracardiale echografie catheters voor interventie structural heart defects (zoals mitralisklepvervangings, aortaklepvervangings, afsluiten van gaten in het atriale septum, afsluiten van het linker atrium aanhangsel).

Looptijd 5 jaar, 3 experimenten per jaar, per experiment 3 dieren. Totaal: 45 dieren.

Onderdeel 2: Testen van intracardiale echografie catheters voor interventionele ablatie procedures (zoals, boezemfibrilleren, flutter).

Looptijd: 5 jaar, 3 experimenten per jaar, per experiment 3 dieren. Totaal: 45 varkens.

Onderdeel 3: Testen van intracardiale echografie catheters voor drie-dimensionale beeldvorming.

Looptijd: 5 jaar, 3 experimenten per jaar, per experiment 1 of 2 dieren. Totaal: maximaal 30 dieren

Doordat hetzelfde dier op dezelfde dag voor onderdeel 1, 2 en 3 ingezet kan worden wordt het totaal aantal dieren geschat op de helft van de optelsom van de drie onderdelen (45+45+30/2): maximaal 60. Door zoveel mogelijk te combineren zullen hierdoor een minimaal aantal dieren worden gebruikt.

Indien mogelijk willen we graag gebruik maken van varkenspatiënten met hartafwijkingen. De keuze hiervoor zal afhangen van hun beschikbaarheid en de mogelijkheid deze in te passen in de planning van het onderzoek.

---

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

---

De logische samenhang van de verschillende onderdelen is het intracardiale imaging concept via een catheterisatie procedure in varkens. In essentie worden verschillende onderdelen zoals de catheter stuurbaarheid en de echografie beeldvorming voor verschillende klinische applicaties getest.

---

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

| Volgnummer | Type dierproef                         |
|------------|--|
| 1          | Intracardiale echografie in het varken |
| 2          |  |
| 3          |  |
| 5          |  |
| 6          |  |
| 7          |  |
| 8          |  |
| 9          |  |
| 10         |  |



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="1"/> | <input type="text" value="Intracardiale echografie in het varken"/> |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Er zal intracardiale echografie plaatsvinden in het varken. Hierbij zal gekeken worden naar de manoeuvreerbaarheid van de nieuw ontwikkelde catheters in de vaten en het hart, de mechanische bestuurbaarheid en positionering in een kloppend hart en visualisatie van bepaalde anatomische onderdelen (zoals mitralisklep, longvenen, aortaklep) in het hart door de catheter.

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 varkens ondergaan een hart catheterisatie met een intracardiale echografie catheter onder algehele anesthesie. Hierbij kan het hart en de catheter in beeld worden gebracht met behulp van standaard echografie technieken (transthoracaal of transesophageaal) en fluoroscopisch met behulp van contrastmiddel. Daarnaast kan een endoscoop worden ingebracht om de bovenste luchtweg te inspecteren. Experimenten worden binnen één dag uitgevoerd, waarna het dier direct wordt geëuthanaseerd. Indien mogelijk worden dieren gebruikt in hetzelfde experiment voor de verschillende onderdelen zoals het testen van intracardiale echografie catheters voor interventionele structurele hasrt problemen (mitralisklepvervanging, aortaklepvervanging, etc), het testen van intracardiale echografie catheters voor interventionele ablatie procedures (boezemfibrilleren, flutter, etc), het testen van intracardiale echografie catheters voor drie-dimensionale beeldvorming.

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

Aangezien in deze studie geen groepen met elkaar vergeleken worden en de uitkomstparameters moeilijk in getallen te vatten zijn, is het in dit geval niet mogelijk om een statische onderbouwing te geven. Er is bij het bepalen van het aantal te gebruiken dieren uitgegaan van het aantal doeleinden waartoe de nieuwe catheters ontwikkeld worden (twee verschillende interventies in het hart en een nieuwe beeldvormende technologie), aantal experimenten dat we verwachten uit te voeren voor elk doeleind per jaar en het aantal dieren per experiment (zie document Project voorstel 3.4). Aangezien een dier tegelijkertijd voor meerdere doeleinden gebruikt kan worden, verwachten we met de helft van het aantal dieren toe te kunnen (maximaal 60).

## **B. De dieren**

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

diersoort: varken, gezond; herkomst: de varkens zijn afkomstig van een leverancier die SPF varkens levert; geschatte aantal: maximaal 60; volwassen varken vanaf 60kg.

Er is gekozen voor het varken aangezien de diameter van de bloedvaten in deze diersoort en omdat de afmetingen van het varkenshart vergelijkbaar zijn met die van een humaan hart. Doordat in een dier tegelijkertijd de verschillende onderdelen getest kunnen worden, wordt zo getracht het totale aantal dieren te beperken. Er is voor gekozen om het dier, na de handelingen onder anesthesie, aansluitend te doden waardoor het ongerief 'terminaal' is.

Indien mogelijk willen we graag gebruik maken van varkenspatiënten met hartafwijkingen. De keuze hiervoor zal afhangen van hun beschikbaarheid en de mogelijkheid deze in te passen in de planning van het onderzoek.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de



keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Nieuw ontwikkelde catheters zullen vooraf op mechanische en beeldvormende kwaliteiten getest worden mbv bijvoorbeeld computer simulaties, fantoom modellen en ex vivo studies. Om een catheter te kunnen testen op stuurbaarheid en het juist kunnen positioneren in het hart zal deze via een bloedvat ingebracht moeten worden en tot in de hart boezems/kamers worden gebracht. Weefsel/anatomische eigenschappen die hierbij van belang zijn, zijn niet na te bootsen in een model. Bij het visualiseren van hartkleppen en bloedstromingen spelen pompfunctie en hemodynamica een belangrijke rol.

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.

Terminaal experiment waarbij het dier niet uit anesthesie bijkomt.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

Niet van toepassing

### **Huisvesting en verzorging**

#### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

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

#### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

#### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het onder anesthesie brengen van het dier zal stress geven

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

-

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

Experimenten worden uitgevoerd onder algehele anesthesie. Experimenten worden binnen één dag uitgevoerd, waarna het dier wordt 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.

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.

Terminaal

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Omdat het gebruik van de nieuwe catheters wordt getest voor therapeutisch toepassingen zoals sluiting van linker atrium aanhangsel (left atrial appendage [LAA] closure), ablatie procedures in linker boezem, mitralisklep vervanging (mitral valve replacement), aorta klep vervanging (aortic valve replacement), atrium septum defect sluiting (atrial septum closure), transseptale punctie (atrial septal puncture), die met ongerief na ontwaken gepaard kunnen gaan en waardoor de dieren ook niet meer geschikt zijn voor andere experimenten, zullen de dieren niet bijkomen uit de anesthesie.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

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

1. Aanvraagnummer : 2015.II.532.016
2. Titel van het project : Nieuwe catheters voor echografie in het hart
3. Titel van de NTS : Nieuwe catheters voor echografie in het hart

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 08-06-2015
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 17-06-2015
- anderszins behandeld: per email 06-07-2015
- termijnonderbreking(en) van / tot : 22-06-2015 tot 03-07-2015
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 30-07-2015

#### 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 22-06-2015
- Strekking van de vraag / vragen:  
Niet Technische Samenvatting:
  - Enkele tekstuele wijzigingen.

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Graag in het projectvoorstel opnemen wie de catheters ontwikkelt en om hoeveel verschillende catheters gaat het? In hoeverre is hier sprake van samenwerking met de industrie? Graag nader toelichten.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U test waarschijnlijk meerdere catheters. Worden al deze catheters getest op alle defecten die worden aangebracht? Graag toelichten.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC raadt u aan gebruik te maken van varkenspatiënten indien deze aanwezig zijn. Graag uw visie en dit eventueel ook opnemen in de bijlage bij punt B.

- Datum antwoord: 03-07-2015

- Strekking van het (de) antwoord(en):

#### Niet Technische Samenvatting

- Enkele tekstuele wijzigingen zijn aangebracht

#### Projectvoorstel

- Dit punt is opgenomen in 3.1 van de projectaanvraag. Er is hier sprake van samenwerking met de industrie, maar er is geen sprake van contract research. Het belang van de groep is puur wetenschappelijk en deze experimenten zullen dan na verwachting ook leiden naar publicatie van wetenschappelijke artikelen in tijdschriften.
- Niet alle catheters zullen op alle defecten getest worden in de vroege ontwikkelingsfase. Hier zal de focus met name op de verbetering van de handeling en/of beeldvorming liggen afhankelijk van de toegepaste ontwikkelingsstap. Deze informatie is opgenomen in het projectvoorstel.
- Onderzoekers willen in het kader van de 3V's het aantal proefdieren zover mogelijk verminderen en tevens dieren die voor andere doeleinden niet geschikt zijn, door bv. hartafwijkingen, gebruiken. Het idee om varkenspatiënten hiervoor te gebruiken zal worden meegenomen. Indien deze beschikbaar zijn en in te plannen zijn maken onderzoekers hier graag gebruik van. Deze informatie is toegevoegd aan het projectvoorstel en de bijlage beschrijving dierproeven.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

#### 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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

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

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
  - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan de ontwikkeling en verificatie van intracardiale echografie catheters. Deze translationele studie is erop gericht de visualisatie van specifieke hart onderdelen voor, tijdens en na cardiale interventionele catheterisatie procedures te verbeteren, zodat de negatieve gevolgen van de huidige methode, Röntgen visualisatie, voorkomen kan worden.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
  - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De dieren worden onder narcose gebracht, wat lichte stress kan veroorzaken, en vervolgens onder anesthesie gedood, waardoor het ongerief minimaal is.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De nieuw ontwikkelde catheters zullen vooraf op mechanische en beeldvormende kwaliteiten getest worden met behulp van, computer simulaties, fantoom modellen en/of ex-vivo studies. Na deze fase dienen de catheters getest te worden op stuurbaarheid en het juist kunnen positioneren in het hart. De catheters zullen daarom via een bloedvat ingebracht moeten worden tot in de hart boezems/kamers. De weefsel- en anatomische eigenschappen die hierbij van belang zijn en de pompfunctie en hemodynamica, die voor het visualiseren van hartkleppen en bloedstromingen een belangrijke rol spelen, zijn helaas niet na te bootsen in een proefdiervrij model.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Zoals bij punt 7 reeds aangegeven worden de nieuw ontwikkelde echografie catheters eerst uitvoerig getest in fantomen en ex-vivo modellen en zullen de catheters pas op dieren getest worden wanneer ze voldoende presteren en vertaald kunnen worden naar de in-vivo situatie. In dit project zullen verschillende aspecten van de nieuwe catheters in hetzelfde dier getest worden. Daarnaast worden in één dier zoveel mogelijk klinische relevante toepassingen bestudeerd. Al deze strategieën leiden ertoe dat er een aanzienlijke reductie in het aantal benodigde dieren optreedt.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is gekozen voor het gebruik van varkens omdat het varkenshart qua afmetingen gelijk is aan het menselijke hart. Ook de veneuze en atriale toegang tot het hart is gelijk aan die van een volwassen mens. Om het ongerief te beperken is ervoor gekozen de dieren niet bij te laten komen uit de anesthesie, maar onder narcose te euthanaseren, waardoor het ongerief beperkt blijft. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het ontwikkelen en verifiëren van intracardiale echografie catheters met als doel de visualisatie van specifieke hart onderdelen voor, tijdens en na cardiale interventionele catheterisatie procedures, substantieel is. De DEC is van mening dat gekozen is voor de juiste onderzoeksstrategie en dat de genoemde handelingen noodzakelijk zijn voor het

bereiken van het gewenste doel. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in een proefdierenvrij model. Vooraf zijn reeds ex vivo proeven uitgevoerd. Doordat de dieren onder anesthesie worden geëuthanaseerd is er sprake van terminaal ongerief.

Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van het verwerven van inzicht in de factoren die mogelijk gerelateerd aan het verlies van controle over het gebruik van middelen als alcohol en cocaïne, opweegt tegen het ten hoogste matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

### **E. Advies**

#### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is.
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren.
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag.
  
- 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 een ministeriële ontheffing vereist.
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.
  
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

#### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015205

**Bijlagen**

2

Datum 07-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015205. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 augustus 2015  
Geplande einddatum: 30 juni 2020  
Titel project: Nieuwe catheters voor echografie in het hart  
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe catheters voor echografie in het hart  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utecht  
Datum: 4 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015205

**Bijlagen**

2

Datum 07-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 7 augustus 2015

Vervaldatum: 6 september 2015

Factuurnummer: 201570205

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD115002015205 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU - ASC  
Postbus 80011  
3508 TA Utrecht

o.v.v. CB.841910.3.01.011  
info.asf@uu.nl

**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  
AVD115002015205

## Factuur

Factuurdatum 7 augustus 2015  
Vervaldatum 6 september 2015  
Factuurnummer 201570205  
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

### Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD115002015205

### Bedrag

€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht  
t.a.v. [REDACTED]  
Postbus 12007  
3501AA 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  
AVD115002015205

Datum 18 augustus 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED]

Op 7 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Nieuwe catheters voor echografie in het hart' met aanvraagnummer AVD115002015205. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Onduidelijkheden**

U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van varkens. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan beter onderbouwen waarom het belangrijk is alleen dieren van een geslacht te gebruiken?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

**Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk **donderdag, 20 augustus 2015**, uw antwoord aan ons te sturen.



**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.

**Datum**

18 augustus 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015205

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



Reactie op Aanvraagnummer AVD115002015205:

Geachte dames en heren,

Graag geef ik bij deze nader toelichting op onze aanvraag met het nummer AVD115002015205. De CCD vroeg om meer informatie over het geslacht van de dieren:

“U beschrijft in de bijlages beschrijving dierproeven het gebruik van varkens. De CCD hecht er aan dat het aantal dieren in voorraad gedood terug te dringen. Kunt u toelichten of het mogelijk is dieren van beide geslachten te gebruiken en als dit niet mogelijk is kunt u dan beter onderbouwen waarom het belangrijk is alleen dieren van een geslacht te gebruiken?”

Voor het beantwoorden van onze onderzoeksvraag is het geslacht van de varkens niet van belang, daarom hebben wij het ook niet gespecificeerd in onze aanvraag. Maar in de praktijk is het gebruik van mannelijke varkens van dit gewicht niet wenselijk. De mannelijke dieren zijn in de omgang een stuk bewerkelijker en gevaarlijker dan vrouwelijke dieren. Ze kunnen agressief zijn en kunnen ook bijten. Dit gedrag komt eigenlijk niet voor bij vrouwelijke dieren. Daarom werken we in de praktijk vooral met vrouwelijke dieren.

Daarnaast hebben wij navraag gedaan bij onze leverancier van de SPF varkens. Dit is een regulier fok en vleesvarken bedrijf welke ook dieren levert voor onderzoek. Er is hier dus op geen enkele manier sprake van het doden van dieren in voorraad, omdat alle dieren worden gebruikt. Als ze niet worden gebruikt voor onderzoek dan worden ze ingezet voor de fok of voor het vlees.

Ik hoop u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet.




## Centrale Commissie Dierproeven



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

[REDACTED]  
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
3501AA Utrecht  


### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-2800028 (10 ct /min)

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015205

### Bijlagen

1

Datum 2 september 2015

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Nieuwe catheters voor echografie in het hart' met aanvraagnummer AVD115002015205. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 augustus 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld naar aanleiding van vragen van de CCD over het geslacht van de te gebruiken dieren.

### Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project 'Nieuwe catheters voor echografie in het hart' starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 september 2015 tot en met 30 juni 2020. De looptijd van de vergunning wijkt af van uw aanvraag omdat de startdatum in uw aanvraag in het verleden ligt.

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 5 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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.

**Datum**  
2 september 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015205

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning
- Hiervan deeluitmakend: - DEC-advies
- Weergave wet en regelgeving



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en woonplaats: 3501AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 september 2015 tot en met 30 juni 2020, voor het project 'Nieuwe catheters voor echografie in het hart' met aanvraagnummer AVD115002015205, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven ontvangen bij digitale indiening op 7 augustus 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 7 augustus 2015;
  - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 7 augustus 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht d.d. 30 juli 2015 en ontvangen op 7 augustus 2015;
  - d. Aanvullingen ontvangen op 19 augustus 2015

### Dierproeven

| Naam dierproef                         | Diersoort | Aantal dieren voor het vergunde tijdvak | Ernst     |
|--|-----------|---|-----------|
| Intracardiale echografie in het varken | Varkens   | 60                                      | Terminaal |

### Voorwaarde:

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

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onvermijdelijk is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade zal blijven

**Datum**  
2 september 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015205

ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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



| Inventaris Wob-verzoek W16-04s |                              |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                              | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                     | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS 20151206</b>          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 1                              | Aanvraagformulier            |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 2                              | Projectvoorstel              |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 4                              | Bijlage dierproeven 1        |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 5                              | Bijlage dierproeven 2        |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 6                              | Bijlage dierproeven 3        |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 7                              | DEC-advies                   |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 8                              | Ontvangstbevestiging         |                 |      |        |       |                   | x      |        |      |
| 9                              | Advies aan CCD               |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 10                             | Beschikking en vergunning    |                 |      |        |       |                   | x      |        |      |



# Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

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

|   |                              |
|---|------------------------------|
| Naam instelling of organisatie                      | UMC Utrecht                  |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                   |
| KvK-nummer  | 3 0 2 4 4 1 9 7              |
| Straat en huisnummer                                | Instantie voor Dierenwelzijn |
| Postbus   | 12007                        |
| Postcode en plaats                                  | 3501AA Utrecht               |
| IBAN  | NL27INGB000005267            |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Universiteit Utrecht         |

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]  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [Redacted]  |   |
| Afdeling                    | Cardiologie |   |
| Telefoonnummer              | [Redacted]  |   |
| E-mailadres                 | [Redacted]  |   |

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

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

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |
| Afdeling                    |  |
| Telefoonnummer              |  |
| E-mailadres                 |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- 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 - 09 - 2015 |
| Einddatum  | 01 - 08 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- ACDC - Electroporatie ablaties
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ablaties van het hart
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11500
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universitair Medisch Centrum Utrecht
- 1.3 Vul de titel van het project in. ACDC – cardiale electroporatie ablaties

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.  
*U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
  - Translationeel of toegepast onderzoek
  - Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
  - Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
  - Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
  - Hoger onderwijs of opleiding
  - Forensisch onderzoek
  - Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Hartritimestoornissen vormen een belangrijke oorzaak van ziekte en overlijden bij mensen. De behandeling hiervan kan d.m.v. medicatie en/of catheterablatie gebeuren. Catheterablatie is een nieuwe succesvolle behandeling voor patiënten met boezemfibrilleren. Door middel van een radiofrequente (RF) stroom worden in de linker boezem laesies aangebracht rond de inmondingen van de longvenen om deze elektrisch van de linker boezem te isoleren.

Tot 15 jaar geleden was gelijkstroom (direct current (DC)) ablatie de techniek voor ablaties. Hierbij wordt met een externe defibrillator kortdurend een hoge stroom via een endocardiale catheter door de hartspier gestuurd (shock). DC-ablaties leidden destijds tot veel complicaties (vonken en schokgolven) en met de meer elegante RF- techniek (warmte), is deze toch zeer effectieve DC-methode in onbruik geraakt. Bij DC-ablatie worden relatief grote laesies gemaakt, direct gerelateerd aan de ingestelde energie (Joule); ook worden er laesies gevormd wanneer er geen compleet wandcontact is. De huidige ablatietechnieken hebben vaak een onvoldoende lang termijn werkzaamheid (door onvoldoende laesiediepte en/of -grootte), of een verhoogd complicatierisico. Zo kunnen er bij RF door de warmte ook ongewenste effecten optreden als coagulatie van het bloed, stenose van vaten, atrium-oesofagiale fistel of parese van het diafragma. DC-ablatie is hierdoor mogelijk een veel geschiktere methode voor longvenenisolatie dan RF-ablatie.

In de afgelopen jaren heeft onze onderzoeksgroep de DC-ablatie techniek aangepast, zodat er geen vonken en schokgolven meer ontstaan en de techniek dus veilig gebruikt kan worden. Deze vernieuwde nieuwe ablatiemethode, irreversibele electroporatie (IRE), is in staat goede (diep en breed) laesies te kunnen maken waarbij goed als geen complicaties optreden[1-7]. Onze studies laten de potentie zien van IRE om diepe brede laesies te maken [1,3], bruikbaar te zijn voor bijvoorbeeld minimaal invasieve pulmonaal venen isolaties [2,4] waarbij er geen stenose optreedt [5] en geen schade ontstaat aan in het weefsel gelegen bloedvaten [6] en zenuwen [7]. Een andere complicatie bij de huidige RF-ablaties is het ontstaan van een atrium-oesofagiale fistel, deze complicatie is bijna altijd dodelijk voor de patient. In nieuw onderzoek (ongepubliceerd) laten we zien dat de huidige nieuwe techniek, IRE, geen schade geeft aan de slokdarm, zelfs niet als deze therapie direct op de slokdarm wordt afgegeven.

Deze nieuwe techniek is uitgevonden door twee leden van het onderzoeksteam die nog steeds direct bij het onderzoek betrokken zijn. Momenteel is onze onderzoeksgroep de enige groep die onderzoek doet naar het gebruik van IRE voor toepassingen in het hart. Dit onderzoek is een belangrijke stap voorwaarts in de catheterbehandeling van hartritimestoornissen. Binnen de huidige onderzoekslijn is het de verwachting dat op korte termijn (<1 jaar) een eerste translatie kan worden gemaakt naar de mens. Om dit te realiseren wordt er nauw samengewerkt met St. Jude Medical. Deze firma zorgt onder andere voor de ontwikkeling van en aanpassingen aan de gebruikte catheters.

De eerste humane onderzoeken zullen zich focussen op het uitvoeren van pulmonaal venen isolaties. Voordat deze nieuwe methode gebruikt kan worden in patiënten dienen er nog enkele onderzoeken te worden verricht. Hierbij valt te denken aan bijvoorbeeld onderzoek naar het gebruik van andere doorontwikkelde catheters die bij de mens nodig zijn. Bij het gebruik van andere maten catheters zal de laesie diepte, die bij een bepaalde energie hoort, anders zijn, maar zijn er mogelijk ook andere maten elektrodes op de catheter nodig. Naast deze specifiek technische onderzoeksonderwerpen dienen er ook nog verschillende veiligheidsaspecten onderzocht te worden met betrekking tot de (nieuwe) catheters. Daarnaast is het aannemelijk dat er tijdens de eerste

humane procedures specifiek onderzoeksvragen naar voren komen die verder preklinisch onderzoek vereisen. Hierbij kan men bijvoorbeeld denken aan bepaalde geobserveerde effecten die tijdens eerder onderzoek niet naar voren zijn gekomen. Naast de specifieke focus op het optimaliseren van de IRE methode voor pulmonaal vena isolaties zullen wij ook onderzoek doen naar andere toepassingen voor deze techniek binnen de cardiologie. Hierbij val te denken aan bijvoorbeeld ablaties in de rest van de boezem, maar ook in de ventrikel voor bijvoorbeeld VT-ablaties. Ook verbeteringen aan de IRE techniek zelf zullen onderzocht worden. Zo wordt er nu gebruik gemaakt van gelijk stromen, deze zorgen voor een spiercontractie bij de patiënt. Door gebruik te maken van (hoog frequente) wisselstroom zou dit probleem opgelost kunnen worden.

Literatuur voorkomend uit huidige onderzoekslijn:

1. Wittkamp FHM, van Driel VJ, van Wessel H, et al. (2012) **Myocardial lesion depth with circular electroporation ablation**. *Circulation Arrhythmia and electrophysiology* 5:581–6. doi: 10.1161/CIRCEP.111.970079
2. Wittkamp FH, van Driel VJ, van Wessel H, et al. (2011) **Feasibility of electroporation for the creation of pulmonary vein ostial lesions**. *Journal of cardiovascular electrophysiology* 22:302–9. doi: 10.1111/j.1540-8167.2010.01863.x
3. Neven K, van Driel V, van Wessel H, et al. (2014) **Myocardial Lesion Size After Epicardial Electroporation Catheter Ablation After Subxiphoid Puncture**. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 7:728–733. doi: 10.1161/CIRCEP.114.001659
4. Neven K, van Driel V, van Wessel H, et al. (2014) **Safety and Feasibility of Closed Chest Epicardial Catheter Ablation Using Electroporation**. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 7:913–919. doi: 10.1161/CIRCEP.114.001607
5. van Driel VJHM, Neven KGEJ, van Wessel H, et al. (2014) **Pulmonary Vein Stenosis After Catheter Ablation: Electroporation Versus Radiofrequency**. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 7:734–738. doi: 10.1161/CIRCEP.113.001111
6. du Pré BC, Driel VJ Van, Wessel H Van, et al. (2013) **Minimal coronary artery damage by myocardial electroporation ablation**. 144–149. doi: 10.1093/europace/eus171
7. van Driel VJHM, Neven K, van Wessel H, et al. (2015) **Low vulnerability of the right phrenic nerve to electroporation ablation**. *Heart Rhythm*. doi: 10.1016/j.hrthm.2015.05.012

### 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 het geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Binnen de aangevraagde vergunningsperiode willen we de volgende doelen realiseren:

1. De laatste benodigde experimenten uitvoeren die nodig zijn voor een translatie naar de eerste klinische onderzoeken
  - a. Testen va nieuwe catheters:
    - i. De exacte relatie tussen energie en laesiediepte
    - ii. De relatie tussen catheter grootte/energie/laesiediepte
    - iii. Bruikbaarheid voor pulmonaal vena isolatie
  - b. Veiligheid bij gebruik van hogere energieën
2. Het onderzoeken van nog opkomende vraagstukken voor en tijdens de introductie van deze nieuwe methode in de kliniek
  - a. Testen aan eventueel nieuwe catheters die worden ontwikkeld
  - b. Additionele veiligheid testen met betrekking tot therapie

- c. Nieuwe vormen van contact metingen voor meten van catheter-weefsel contact (=belangrijk voor effectiviteit)
3. Onderzoeken van nieuwe/andere toepassingen en doorontwikkelingen van deze nieuwe techniek binnen de cardiologie
  - a. Onderzoeken hoog frequente golfvormen om de spiercontracties te vermijden
    - i. Verschillende frequenties, energieën en pulsvormen en resulterende laesiediepte
  - b. Andere toepassing van IRE binnen de cardiologie onderzoeken
    - i. In atria voor behandeling AF
    - ii. In ventrikel voor ablatie van VT's of bv AV-knoop ablaties

#### Haalbaarheid:

Volgens de huidige planning zal er binnen één jaar een translatie van dit onderzoek naar de kliniek worden gemaakt. Om dit te realiseren moeten, zoals hierboven beschreven, nog enkele specifieke onderzoeken worden uitgevoerd. Uit voorgaand vergelijkbaar onderzoek is gebleken dat dit type experimenten een ondubbelzinnige uitkomst hebben en dat een goed opgezette proef vaak voldoende is om de specifieke onderzoeksvraag te beantwoorden. Voor dit onderzoek wordt samengewerkt met meerdere ervaren elektrofysiologen (cardiologen) en technici die vanaf het begin af aan bij het project betrokken zijn. Tijdens dit onderzoek maken we gebruik van de uitstekende infrastructuur binnen het Gemeenschappelijk Dieren Laboratorium (GLD; UMC Utrecht) waarin meerdere operatiekamers beschikbaar zijn voor dit soort proeven, daarnaast is ook alle vereiste apparatuur aanwezig. De ontwikkeling van bijvoorbeeld de catheters worden door een nauw betrokken grote medische firma uitgevoerd en bekostigd.

In het recente verleden hebben we al meermaals succesvol experimenten gedaan die ons veel informatie hebben verschaft over de toepassing van deze nieuwe therapie. De experimenten hebben altijd een duidelijk uitkomstmaat die eenvoudig toetsbaar is (meestal op histologie) en direct de weg vrij maakt voor vervolg onderzoek op weg naar de introductie in de kliniek.

### 3.3 Belang

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

Hartritmestoornissen vormen een belangrijke oorzaak van ziekte en overlijden bij mensen. De huidige ablatietechnieken hebben vaak een onvoldoende lange termijn werkzaamheid (door onvoldoende diepte en/of -grootte van het beschadigde weefsel), hierdoor loopt het percentage patiënten dat binnen vijf jaar nog een behandeling moet ondergaan op tot 50%. Deze therapie (RF-ablatie) brengt ook complicaties met zich mee zoals eerder beschreven (3.1)

In de afgelopen vijf jaar heeft onze onderzoeksgroep een nieuwe ablatiemethode ontwikkeld, waarbij wel goede en diepe weefselbeschadiging gemaakt konden worden, maar zo goed als geen complicaties optraden [1-7, 3.1]. Dit onderzoek kan een belangrijke stap voorwaarts zijn in de behandeling van hartritmestoornissen. De verwachting is dat deze nieuwe therapie zal zorgen voor een effectievere behandeling met minder complicaties.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Er zijn reeds veel proeven uitgevoerd in het kader van dit onderzoek. Voordat we deze techniek in de kliniek kunnen introduceren moeten nog een aantal onderwerpen onderzocht worden. Dit onderzoek richt zich op de volgende punten:



Testen met nieuwe catheters:

- Effecten van andere diameter op o.a. laesie diepte
- Veiligheid met betrekking tot de te gebruiken energieniveaus
- Bruikbaarheid in combinatie met sheaths (buisje waardoor catheter opgevoerd kan worden naar het hart)

Pulmonaal venen isolatie

- Het bepalen van de effectiviteit van een nieuwe methode voor contactmetingen om zo het catheter-weefsel contact te verbeteren
- De contactmetingen met de nieuwe catheters (**contact tussen catheter en weefsel is erg belangrijk voor de effectiviteit van de therapie**)

Uit deze initiële onderzoeken zal blijken of de nieuwe catheter geschikt is voor het gebruik in mensen. Omdat ook de diameter van de **catheter vrij instelbaar is**, zal de bereikte laesie diepte met een bepaalde energie veranderen. Uit dit onderzoek zal naar voren komen welke energie niveaus nodig zijn voor het maken van laesies die diep genoeg zijn. Tevens zal onderzocht worden tot welk energieniveau de techniek veilig is (lees: geen complicaties optreden). Daarnaast wordt de handelbaarheid van de catheter in combinatie met andere instrumenten, zoals sheaths, onderzocht. Deze onderzoeken lopen parallel en kunnen in veel gevallen worden gecombineerd binnen één proef om het benodigde aantal dieren te verminderen. Zo worden bij de terminaties tijdens de laesiediepte experimenten vaak extra proeven uitgevoerd om bijvoorbeeld de bruikbaarheid en veiligheid van nieuwe catheters te testen.

Na deze initiële onderzoeken is het de verwachting dat er kan worden begonnen met een eerste fase onderzoek in de kliniek. **Dit is mogelijk doordat het patiënt gebonden onderzoek in deze fase een safety en feasibility studie betreft. In een dergelijke studie wordt alleen onderzocht of de techniek veilig te gebruiken is en of de methodes bruikbaar zijn voor het te bereiken doel (haalbaarheid).**

Nadat de bovenstaande onderdelen van het project zijn uitgevoerd zal verder onderzoek worden gedaan met als doel de gebruikte methoden te verbeteren. **Hierbij zullen voor het uitvoeren van ieder onderzoek de resultaten van voorgaande onderzoeken worden gebruikt om het onderzoek te verfijnen. Hierbij zijn natuurlijk de feedback en resultaten vanuit de kliniek leidend.** Dit onderzoek zal hoofdzakelijk bestaan uit de volgende punten:

- Nieuwe methoden voor het gebruik van IRE (hoog frequent)
- Precieze effecten van de therapie op het weefsel (histologisch) op verschillende tijdstippen na therapie
- Verder onderzoeken contactmetingen
- Ablaties op andere plaatsen in het hart dan de pulmonaalvenen

Deze onderzoeken zullen parallel lopen aan elkaar en zullen vaak kunnen worden gecombineerd in een proef. Er wordt momenteel onderzoek gedaan naar andere pulsvormen om de IRE ablatie uit te voeren. De IRE zoals beschreven in 3.1 wordt uitgevoerd met een gelijkstroom, dit leidt tot skeletspier contracties tijdens het toedienen van de therapie. Om dit te voorkomen doen wij momenteel onderzoek naar het gebruik van hoog frequente wisselstromen. Met dit onderzoek hebben wij al veel ervaring opgedaan en naar aanleiding daarvan is nieuwe apparatuur ontwikkeld om ook deze pulsen effectief te kunnen toedienen, een artikel hierover wordt momenteel geschreven en beschrijft dat substantiële laesies gemaakt kunnen worden zonder dat de skeletspieren worden geactiveerd. In de geplande proeven zullen wij verder onderzoek doen naar deze doorontwikkeling van IRE.

Een ander onderwerp van onderzoek is naar het precieze effect van de IRE op het weefsel. We weten dat de laesies groot genoeg zijn, maar we weten niet precies in welk tijdsbestek het hartweefsel dood gaat (uren/dagen). Daarom zijn we momenteel bezig dit tot in detail in kaart te brengen. Met de kennis uit deze proeven kunnen we in de toekomst beter inschatten of een pulmonaal venen isolatie kans heeft om toch weer te gaan lekken, wat betekend dat de procedure herhaald moet worden. Deze experimenten worden altijd uitgevoerd in combinatie met een andere proef om zodoende het aantal benodigde

dieren te verminderen.

Bij IRE is het om een goede laesie te maken belangrijk dat de catheter goed contact maakt met het weefsel. Met een catheter in het lichaam kan niet visueel worden gecontroleerd of dit het geval is, daarom is het belangrijk dit te kunnen meten. Hiervoor hebben wij in de afgelopen jaren een methode ontwikkeld dat uitvoerig in modellen, fantomen en in dieren is getest. In het toekomstige onderzoek zullen wij deze metingen verder testen en ontwikkelen om ervoor te zorgen dat de therapie effectiever wordt (lees: minder herprocedures nodig zijn).

De IRE techniek is tot nog toe vooral ingezet voor pulmonaal venen isolaties. Tevens is onderzoek gedaan naar het gebruik voor (epicardiale) ablaties [ref. 3, zie 3.1]. Omdat de techniek met IRE goede leasies laat zien is het aannemelijk dat deze methode ook kan worden ingezet voor nog andere delen van het hart zoals bijvoorbeeld het atrium of het ventrikel zelf. In het lopende onderzoek zoeken wij naar nieuwe toepassingsgebieden voor deze techniek binnen de cardiologie.

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

De drie hoofdlijnen binnen dit onderzoek zijn:

1. Translatie naar kliniek
2. Het onderzoeken van nog opkomende vraagstukken voor en tijdens de introductie van deze nieuwe methode in de kliniek
3. Onderzoeken van nieuwe/andere toepassingen en doorontwikkelingen van deze nieuwe techniek binnen de cardiologie

1. Om de translatie naar de kliniek mogelijk te maken moeten nog enkele zaken worden onderzocht die vooral betrekking hebben op het gebruik van nieuwe catheters. Deze catheters verschillen op een aantal punten van de reeds onderzochte variabelen waarbij de belangrijkste de laesie diepte betreft. De laesiediepte die bereikt kan worden met een bepaalde grootte catheter hangt van verschillende factoren af, welke hier worden onderzocht. Ook na de introductie in de kliniek is het aannemelijk dat er nog wijzigingen worden gedaan aan het ontwerp van de catheter die moeten worden getest.

2. Tijdens de eerste klinische testen zullen zeer waarschijnlijk nieuwe vraagstukken opkomen welke verder preklinisch onderzoek vereisen. Hierbij kan men denken aan bepaalde problemen die zich voordoen tijdens het uitvoeren van de pulmonaal venen isolaties. Daarnaast zal er verder worden gewerkt aan het nog effectiever maken van het volledige proces, bijvoorbeeld door ervoor te zorgen dat het wandcontact van de catheter beter kan worden gemeten om zo de toegediende therapie effectiever te maken.

3. Parallel aan de andere onderzoekslijnen zal worden gekeken naar andere praktische toepassingen van deze techniek binnen de cardiologie. Omdat de techniek met IRE goede leasies laat zien is het aannemelijk dat deze methode ook kan worden ingezet voor nog andere delen van het hart zoals bijvoorbeeld het atrium of het ventrikel zelf.

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

De eerste hoofdlijn heeft als doel de IRE techniek voor cardiale ablaties naar de kliniek te brengen. Het onderzoek in deze lijn zal snel starten (verder gaan) om een introductie in de kliniek (mijlpaal) mogelijk te maken.

Als deze mijlpaal is bereikt zal ook worden gecontinueerd met het (reeds) lopende onderzoek in de ander twee lijnen. Omdat het ook na de klinische introductie aannemelijk is dat er nog wijzigingen worden gedaan aan bijvoorbeeld het ontwerp van de catheter zal ook lijn 1 worden doorgezet. Om het aantal benodigde dieren te verminderen zal er zoveel mogelijk worden gepoogd bepaalde onderzoeken samen te voegen. Dit kan ook betekenen dat

onderzoeken beschreven in verschillen proeven kunnen worden uitgevoerd in één onderzoek.

Keuze om bepaalde onderzoeken door te zetten zullen altijd worden genomen naar aanleiding van de resultaten. Hierbij moet voor de onderzoeksgroep de klinische relevantie en/of het wetenschappelijk belang duidelijk aanwezig zijn.

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

| Volgnummer | Type dierproef                              |
|------------|---|
| 1          | Effecten van IRE parameters op laesdiepte   |
| 2          | Pulmonaal venen isolatie en contactmetingen |
| 3          | Doorontwikkelingen van IRE                  |
| 4          |   |
| 5          |   |
| 6          |   |
| 7          |   |
| 8          |   |
| 9          |   |
| 10         |   |



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11500
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universitair Medisch Centrum Utrecht
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. Volgnummer 1 Type dierproef Effecten van IRE parameters op laesiediepte

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Bij alle hieronder beschreven proeven zullen varkens (60-75kg) worden gebruikt. Er wordt in deze onderzoekslijn/model onderscheid gemaakt tussen drie verschillende proeven:

1. Catheter ring grootte. Bij dit onderzoek zal er op dag 0 een ingreep worden uitgevoerd. Tijdens deze ingreep zullen epicardiaal (met open thorax) verschillende laesies worden aangebracht middels de irreversible electroporatie (IRE) techniek. Hierbij worden verschillende groottes catheters gebruikt om zo het effect van een grotere ring op de bereikte

laesiediepte te onderzoeken. Op dag 21 zal het dier worden geëthanaseerd om de laesiediepte te beoordelen. De primaire uitkomstparameters zullen bij beide proeven de laesiediepte gemeten op histologie zijn.

2.

Verschillende IRE energieën. Bij dit onderzoek zal er op dag 0 een ingreep worden uitgevoerd. Tijdens deze ingreep zullen epicardiaal (met open thorax) verschillende laesies worden aangebracht middels de IRE techniek. Hierbij worden verschillende energieën IRE toegevoerd via de ring catheters om zo het effect van specifieke energie niveaus op de bereikte laesiediepte te onderzoeken. Op dag 21 zal het dier worden geëthanaseerd om de laesiediepte te beoordelen. De primaire uitkomstparameters zullen bij beide proeven de laesiediepte gemeten op histologie zijn.

3.

Veiligheid en bruikbaarheid catheters. Dit betreft terminale experimenten waarbij bijvoorbeeld het effect van meerdere IRE toedieningen met nieuwe catheters met verschillende energieën wordt gemeten. Tevens zullen dan de veiligheid en bruikbaarheid van de nieuwe catheters worden beoordeeld door ervaren elektrofysiologen (cardiologen) die de klinische vervolgstudie zullen uitvoeren. De primaire uitkomsten zullen hier het niet optreden van complicaties zijn alsmede de ervaringen van de experts.

NB. Waar mogelijk zullen de drie proeven worden gecombineerd. Zo is het vaak mogelijk experiment 1 en 2 te combineren in 1 proef. Experiment 3 kan vaak bij een terminatie van een andere proef worden onderzocht. Dit om waar mogelijk het aantal benodigde dieren te verminderen.

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.

Proeven 1 en 2:

- Op dag 0 zullen onder anaesthetie na een sternotomie meerdere (3-4) laesies epicardiaal worden aangebracht middels IRE op de linker kamer.
- Op dag 21 zullen na terminatie onder anaesthetie het hart worden uitgenomen om hieruit histologisch de laesie grootte van alle behandelingen te bepalen.

Na drie weken is het mogelijk histologisch duidelijk onderscheid te maken tussen gezond en behandeld weefsel. In een vroeger stadium is dit onderscheid soms lastig. Bij deze proeven maken wij gebruik van een epicardiale ring catheter zodat er visueel kan worden gecontroleerd of alle elektroden goed contact maken met het weefsel. Als wij gebruik maken van normale (interne) catheters kunnen deze parameters niet worden gecontroleerd waardoor er meer variatie optreedt. Tevens plaatsen wij bij deze proeven de ring op het linker ventrikel, dit is omdat we in dit weefsel de laesiediepte kunnen meten. Als bijvoorbeeld de laesie wordt aangebracht op het atrium of in de pulmonaal vaten, dan zal de laesie transmuraal zijn (helaas niet bedekken). De echte diepte zal veel dieper zijn en kan dan niet worden gemeten, op het linker ventrikel kan dat vanwege de dikte wel. In de voorgaande proeven hebben we gezien dat het gebruik van de grotere 27mm catheterring leidt tot een grotere variatie in laesiediepte dan de voorheen gebruikte 20mm ring. Omdat in het komende onderzoek bij patiënten gebruik gemaakt zal worden van de 27mm ring (vanwege grotere humane anatomie) is het belangrijk de precieze laesie diepte bij het gebruik van deze ring te bepalen. Het is voor de laesievorming erg belangrijk dat alle elektroden die op de catheterring zitten goed contact hebben met het weefsel. De variatie in gemeten laesiediepte met deze ring is deel te wijten aan de moeilijkheid van het bevestigen van deze grotere ring op het epicard. Voor deze experimenten hebben we een nieuw device ontworpen waarmee de catheterring beter gefixeerd kan worden op het hart zodat alle elektroden goed contact maken. Hierdoor denken wij minder variatie in de gemeten laesie diepte te bereiken.

Proef 3:

Dit betreft terminale experimenten waarbij het effect van meerdere IRE toedieningen met nieuwe catheters met verschillende energieën wordt gemeten. Onder anaesthetie zal de betreffende catheter middels een lange sheath via een veneuze toegangsroute en een transseptale punctie in het linker deel van het hart worden gepositioneerd. Hierna

zullen er, zonder dat de catheter weefsel raakt, meerdere (>10) IRE therapieën worden afgegeven (het niet raken van weefsel vergroot de kans op complicaties). Dit heeft als doel te bepalen vanaf welke energie met welke catheter er complicaties kunnen optreden. Tijdens dit proces zullen de klinische parameters van het dier worden gemonitord, tevens worden de parameters van de therapie zelf (voltage, stroom en weerstand) gemeten om zo technische complicaties te detecteren. Tijdens dit gehele proces (ca. 180 min) zal de veiligheid en bruikbaarheid van de nieuwe catheters worden beoordeeld door ervaren elektrofysiologen (cardiologen) die ook de klinische vervolgstudie zullen uitvoeren. Deze proef kan vaak bij een terminatie van een andere proef worden uitgevoerd. Dit om waar mogelijk het aantal benodigde dieren te verminderen. Deze proef zal worden gecombineerd met een andere proef wanneer het de resultaten van de originele proef niet worden verstoord. Zo kan het bijvoorbeeld zijn dat de complicaties die eventueel kunnen optreden bij proef 3 het weefsel beschadigen waardoor de resultaten van proef 1 dan wel proef 2 niet meer met zekerheid bepaald kunnen worden.

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

Het is voor de laesievorming erg belangrijk dat alle electroden die op de catheterring zitten goed contact hebben met het weefsel. De variatie in gemeten laesiediepte met deze ring is deel te wijten aan de moeilijkheid van het bevestigen deze grotere ring op het epicard. Voor deze experimenten hebben we een nieuw device ontworpen waarmee de catheterring beter gefixeerd kan worden op het hart zodat alle electroden goed contact maken, hierdoor denken wij minder variatie in de gemeten laesie diepte te bereiken en zijn er minder dieren nodig. Deze variatie wordt ook verminderd door epicardiale ablaties te gebruiken in plaats van endocardiale laesie, bij epicardiale laesies kan er visueel worden gecontroleerd dat de electroden goed contact maken, zie ook hierboven.

In alle dieren worden voor experimenten 1 en 2 worden in elk dier steeds meerdere methoden (verschillende cathetergrootte of verschillende energien) tegelijk getest. Hierdoor worden in feite de verschillende groepen samengevoegd in 1 dier en kunnen we het aantal benodigde dieren verminderen. Dit is het geval als er op het hart ruimte genoeg is om meerdere laesies aan te brengen. Als dat niet geval is dan zullen proeven 1 en 2 los van elkaar moeten worden uitgevoerd zodat de resultaten elkaar niet in de weg zitten. Wat betreft de statistiek kiezen we ervoor om de laesies binnen 1 dier direct met elkaar te vergelijken.

Daarnaast kijken we naar variatie zoals we ook eerder hebben gezien bij vergelijkbare proeven. We proberen om goed te poweren, want te weinig power levert uiteindelijk het nutteloos gebruik van dieren op, omdat je het effect niet kan detecteren. Teveel dieren is onnodig en daarmee onwenselijk.

Verder zullen we tijdens de duur van het onderzoek de variatie in de resultaten meten en deze meenemen in de daarop volgende experimenten. Bij een (door ons verwachte) dalende variatie per methode zullen er dus minder dieren nodig zijn.

## B. De dieren

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

Voor alle beschreven proeven zullen we gebruik maken van landvarkens vanwege het feit dat deze dieren qua anatomie en (patho)fysiologie het meest op de mens gelijken. De landvarkens komen bij Van Beek (Lelystad) vandaan. Hiervoor kiezen we omdat we goede ervaring met deze diersoorten hebben en qua methodologie op eerdere experimenten willen voortbouwen. Varkens (m/v) zijn circa enkele maanden oud (60-75kg), gezien het feit dat ze zwaarder niet meer goed als proefdieren te hanteren zijn en de gebruikte materialen niet meer passen.

Proef 1 en 2:

In een voorgaand experiment in 3 dieren hebben we laesie dieptes gemeten van 3.8 en 4.8mm voor verschillende energieën, bij beide groepen was de standaarddeviatie gemiddeld 1mm. Om met een zekerheid van minimaal 80% onderscheid te kunnen maken tussen deze groepen met behulp van een

gepaarde T-test zijn in totaal 10 dieren nodig voor een dergelijk experiment.

We gaan ervanuit dat we soortgelijke experimenten de komende 5 jaar 2 maal per jaar zullen moeten uitvoeren in de aanloop naar en tijdens de introductie van de nieuwe technieken in de patientenzorg.

Er zijn voor deze experimenten dan de komende vijf jaar: 5 jaar x 2 Proeven x 1 experimenten x 10 dieren = 100 dieren nodig. (Proeven 1+2)

Daarnaast zullen we tijdens de duur van het onderzoek de variatie in de resultaten meten en deze meenemen in de daarop volgende experimenten. Bij een (door ons verwachte) dalende variatie per methode zullen er dus minder dieren nodig zijn. Dit zullen we echter pas na de eerste proeven kunnen bepalen.

### Proef 3

Voor dergelijke proeven kan geen power berekening worden uitgevoerd. Op basis van uitgebreide ervaring met dit soort experimenten menen wij per experiment 3-5 dieren nodig te hebben. Dergelijke experimenten voeren wij doorgaans 1-3 keer per jaar uit.

Er zijn voor deze experimenten dan de komende vijf jaar: 5 jaar x 3 experimenten x 5 dieren = maximaal 75 dieren nodig. (Proeven 3)

Het maximaal aantal benodigde dieren voor de drie beschreven experimenten bedraagt dan  $50 + 50 + 75 = 175$

### 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.

De terminale experimenten zoals beschreven in proef 3 kunnen in principe bij alle dieren worden uitgevoerd waarbij de eventuele complicaties die optreden (vonken) geen invloed hebben op de resultaten van de originele proef. Dit geldt zoals eerder beschreven vaak voor proeven 1 en 2. Dit kunnen ook dieren zijn van andere onderzoekers.

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.

Het hergebruik zoals hierboven beschreven omvat het toevoegen van een experiment bij terminatie. Dit zal het ongerief voor het dier niet beïnvloeden.

### 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.

Omdat we bij deze proeven de effecten op lange termijn bekijken, is het onmogelijk deze proeven *in vitro* te testen. Hierbij zijn de fysiologische aspecten namelijk niet goed na te bootsen.



Echter hebben wij wel al van tevoren alle scenario's m.b.t. de electrode grootte en verschillende energieën met behulp van wiskundige modellen doorgerekend. Tevens zijn de technische aspecten van deze proeven in *in vitro* modellen getest op hun technische werking. Zo zijn alle gebruikte methoden getest in een zoutoplossing, in bloed en in losse componenten daarvan.

In veel gevallen kunnen proeven 1 en 2 worden gecombineerd binnen 1 dier. Dit is het geval als er op het hart ruimte genoeg is om meerdere laesies aan te brengen. Als dat niet geval is dan zullen proeven 1 en 2 los van elkaar moeten worden uitgevoerd zodat de resultaten elkaar niet in de weg zitten. Proef 3 vaak bij een terminatie van een andere proef worden uitgevoerd om zo waar mogelijk het aantal benodigde dieren te verminderen. Proef 3 zal worden gecombineerd met een andere proef wanneer het de resultaten van de originele proef niet worden verstoord. Zo kan het bijvoorbeeld zijn dat de complicaties die eventueel kunnen optreden bij proef 3 het weefsel beschadigen waardoor de resultaten van proef 1 dan wel proef 2 niet meer met zekerheid bepaald kunnen worden.

Omdat de proeven in deze exacte uitvoering zo zijn opgezet dat we de laesie diepte exact kunnen meten op basis van histologie, is het niet mogelijk deze in mensen te testen. Daarnaast maken we gebruik van zeer ervaren biotechnisch personeel, die ervoor zorgen dat de experimenten weinig complicaties kennen en goed uitgevoerd zullen worden.

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

Periprocurele pijnstilling en dagelijkse monitoring voor ongerief in de eerste week na experiment.

Daarnaast houden we de totale experimentele periode zo kort mogelijk door naar de histologie te kijken zodra het effect van de behandeling zichtbaar is (na drie weken). Naast de benodigde pijnstilling zullen de dieren antibiotica ontvangen om de kans op infecties en het daarbij behorende lijden te minimaliseren. Omdat er mogelijk kans is op het optreden van hartritestroornissen zullen de dieren hiervoor antiaritmica krijgen toegediend.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

X 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.

Vóór de experimenten zullen de dieren in groepen worden gehuisvest. Vanaf de eerste operatie zal het dier solitair gehuisvest worden i.v.m. orale

medicatieoediening. Om het contact met andere varkens onder deze omstandigheden nog enigszins te onderhouden, zullen ze in dezelfde ruimte ondergebracht worden waar ze andere varkens wel nog kunnen horen, ruiken en zien.

**G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

**Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

**H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Dieren zullen mogelijk kortademig worden en tekenen van verminderde hartfunctie (oedeem, cyanose) vertonen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De laesies op de linker kamer kunnen ervoor zorgen dat het hart op die plaats minder goed zal werken, hierdoor zal de totale functie van het hart mogelijk verminderen, maar de ervaring met dit soort experimenten leert dat dit geen hartfalen oplevert.

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

Een goede definitie van het humane eindpunt moet voorkomen dat de schadelijke effecten proportioneel groot worden en tot onverdraagzaam lijden leiden. Conventionele medicijnen zullen teveel interfereren met de studiemedicatie, dus dat zal niet mogelijk zijn. Eventueel zal pijnstilling gegeven worden en zal het varken zo comfortabel mogelijk (eten, goede houding) gemaakt worden.

**J. Humane eindpunten**

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

dieren te voorkomen?

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Geen voedsel/vocht inname. Persistierende dyspnoe, tachypnoe, perifere cyanose, immobiliteit langer dan 36 uur postoperatief. Zichtbare pijn ondanks pijnbestrijding. De eerste 3 dagen na OK zal dagelijks door de onderzoeker of (bij afwezigheid van de onderzoeker) iemand anders van de experimentele cardiologie het dier beoordeeld worden.

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

Uit voorgaande experiment weten wij dat de kans op deze symptomen erg klein is (<3%). Er is tijdens meer dan 80 proeven geen HEP bereikt. Wel is er een maal een dier overleden tijdens de follow up periode, waarschijnlijk door een plotselinge hartritme stoornis.

#### 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.

Proef 1 en 2: ernstige vanwege sternotomie

Proef 3: terminaal

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Uitname van het hart voor histologische analyse van de laesies is het eindpunt van deze studie. Dit is niet verenigbaar met het 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.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 11500
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universitair Medisch Centrum Utrecht
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

|            |   |
|------------|---|
| Volgnummer | Type dierproef                              |
| 2          | Pulmonaal venen isolatie en contactmetingen |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Bij alle hieronder beschreven proeven zullen varkens (60-75kg) worden gebruikt. Het onderzoek zal bestaan uit verschillende elementen waarbij pulmonaal venen isolatie centraal staat. Er worden in deze onderzoekslijn/model onderscheid gemaakt tussen twee verschillende proeven:

1. Pulmonaal venen isolatie. Bij dit onderzoek zal er op dag 0 zal er een pulmonaal venen isolatie (PVI) worden uitgevoerd. Bij deze ingreep zal middels een minimaal invasieve benadering toegang worden verkregen tot het linker atrium. Hierna zullen de pulmonaal venen van het dier een voor een worden geableerd middels de IRE methode. Hierbij zal de nieuw ontwikkelde contact methode worden gebruikt om ervoor te zorgen dat de therapie optimaal wordt

toegediend. In een vervolgv procedure zal de elektrische isolatie worden beoordeeld. De primaire uitkomst parameters zal de aanwezigheid van totale isolatie van het vat zijn.

2. Bruikbaarheid catheter. Bij dit onderzoek zullen we verschillende catheters testen op hun geschiktheid om een pulmonaal vene goed te isoleren. Het is voor de IRE therapie belangrijk dat de catheter goed contact maakt met de wand van het vat, verschillende catheter ontwerpen hebben bepaalde voor en nadelen. Bij dit onderzoek zal de geschiktheid van verschillende ontwerpen getest worden. Eventueel zal in een vervolgv procedure de isolatie worden gecontroleerd. De primaire uitkomst parameter in dit onderzoek is de geschiktheid van de catheter voor deze specifiek procedure. Dit zal worden beoordeeld door een ervaren elektrofysioloog die ook de hieropvolgende humane onderzoeken zal uitvoeren.

NB. Waar mogelijk zullen de twee proeven worden gecombineerd. Zo is het vaak mogelijk experiment 2 uit te voeren bij een van de procedures van experiment 1 (index dan wel terminatie).

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

Proef 1:

a. Op dag 0 zal onder anaesthesie via een veneuze benadering middels een transeptale punctie toegang worden verkregen tot het linker atrium. Hierna zullen op geleide van de contactmeting 1-4 IRE afgiftes worden geplaatst in elk van beide pulmonaal venen met als doel deze elektrisch te isoleren. Eventueel zal er na een korte wachtperiode (30-60 min) worden gecontroleerd of er herstel van geleiding is opgetreden.

b. Op dag 21 dan wel 3 maanden zal onder anaesthesie elektrofysiologisch onderzoek worden verricht naar de mate van isolatie. Hierna zal na terminatie het hart worden uitgenomen voor histologische analyse.

Na drie weken is het mogelijk histologisch duidelijk onderscheid te maken tussen gezond en behandeld weefsel. In een vroeger stadium is dit onderscheid soms lastig. In klinische situaties is het gebruikelijk de elektrische isolatie te beoordelen na minimaal 3 maanden. Er wordt verondersteld dat indien er na 3 maanden geen reconnectie (verlies van isolatie) is opgetreden, dit ook niet gemakkelijk meer zal gebeuren.

Proef 2:

Er zal onder anaesthesie een via een veneuze benadering middels een transeptale punctie toegang worden verkregen tot het linker atrium. Hierna zullen op geleide van de contactmeting 1-4 IRE afgiftes worden geplaatst in elk van beide pulmonaal venen met als doel deze elektrisch te isoleren. Dit zal plaatsvinden met verschillende catheters. Na een wachtperiode (30-90 min) worden gecontroleerd of er herstel van geleiding is opgetreden. Tijdens deze procedure zal de bruikbaarheid van de catheter worden beoordeeld door de elektrofysioloog (cardioloog). Hierbij zal onder andere worden gekeken naar de stuurbaarheid, de positioneerbaarheid en het gebruik in combinatie met andere materialen (bv. Sheaths). Na deze procedure zal het dier worden getermineerd en zal het hart worden uitgenomen voor histologische analyse.

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

Wat betreft de statistiek kiezen we ervoor om de laesies binnen 1 dier direct met elkaar te vergelijken. Daarnaast kijken we naar variatie zoals we ook eerder hebben gezien in ons dierenlaboratorium. We proberen om goed te poweren, want te weinig power levert uiteindelijk het nutteloos gebruik van dieren op, omdat je het effect niet eens zou hebben kunnen detecteren. Teveel dieren is onnodig en daarmee onwenselijk.

Daarnaast zullen we tijdens de duur van het onderzoek de variatie in de resultaten meten en deze meenemen in de daarop volgende experimenten. Bij een (door ons verwachte) dalende variatie per methode zullen er dus minder dieren nodig zijn.

## **B. De dieren**

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

We zullen gebruik maken van landvarkens vanwege het feit dat deze dieren qua anatomie en (patho)fysiologie het meest op de mens gelijken. De landvarkens komen bij Van Beek (Lelystad) vandaan. Hiervoor kiezen we omdat we goede ervaring met deze diersoorten hebben en qua methodologie op eerdere experimenten willen voortbouwen. Varkens zijn circa enkele maanden oud (60-75kg), gezien het feit dat ze dan niet meer goed als proefdieren te hanteren zijn.

Proef1:

In een voorgaand vergelijkbaar experiment in 10 dieren hebben we in respectievelijk 1 en 3 van de dieren lekken gezien. Om met een zekerheid van minimaal 80% onderscheid te kunnen maken tussen deze groepen middels een Chi-kwadraat test onder vergelijkbare of betere condities zijn 20 dieren nodig. Hierbij gaan we uit van 90% succes met de nieuwe methode en 50% succes met de standaard methode.

We gaan ervanuit dat we soortgelijke experimenten de komende 5 jaar 1 maal per jaar zullen moeten uitvoeren in de aanloop naar en tijdens de introductie van de nieuwe technieken in de patientenzorg.

Er zijn voor dit soort experimenten dus de komende vijf jaar: 5 jaar x 1 experimenten x 20 dieren = maximaal 100 dieren nodig.

Daarnaast zullen tijdens de duur van het onderzoek de gemeten variatie in de resultaten meten en deze meenemen in de daarop volgende experimenten. Bij een (door ons verwachte) dalende variatie per methode zullen er dus minder dieren nodig zijn. Dit zullen we echter pas na de eerste proeven kunnen bepalen.

Proef 2:

Voor dergelijke proeven kan geen power berekening worden uitgevoerd. Op basis van uitgebreide ervaring met dit soort experimenten menen wij per experiment 3-5 dieren nodig te hebben. Dergelijke experimenten voeren wij doorgaans 1-2 keer per jaar uit.

Er zijn voor deze experimenten dan de komende vijf jaar: 5 jaar x 2 experimenten x 5 dieren = maximaal 50 dieren nodig.

Het maximaal aantal benodigde dieren voor de twee beschreven proeven bedraagt dan  $100 + 50 = 150$  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.

Indien mogelijk zal er voor proef 2 gebruik worden gemaakt van dieren uit andere proeven. Dit is mogelijk indien de uitgevoerde pulmonaal venen isolatie geen invloed heeft op de originele proef. Als dit wel het geval is dan is hergebruik niet wenselijk.

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.

Het hergebruik zoals hierboven beschreven omvat het toevoegen van een experiment bij terminatie. Dit zal het ongerief voor het dier niet beïnvloeden.

#### **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.

Omdat we bij deze proeven de effecten op lange termijn bekijken is het onmogelijk deze proeven in vitro te testen. Echter hebben wij wel al van tevoren alle scenario's m.b.t. de electrode grootte en verschillende energieën met behulp van wiskundige modellen doorgerekend.

Om het aantal benodigde dieren te verminderen zal er waar mogelijk voor proef 2 gebruik worden gemaakt van dieren uit andere experimenten. De criteria hiervoor zijn hierboven beschreven. Tevens kunnen er bij de dieren uit proef 1 extra experimenten worden uitgevoerd beschreven in de andere typen dierproeven. Dit is mogelijk zolang deze proeven de uitgevoerde isolatie niet beschadigen of beïnvloeden.

Het uitvoeren van dergelijke studies in mensen is in dit stadium onmogelijk vanwege de experimentele opzet. Tevens dient het hart te worden uitgenomen voor histologie.

Daarnaast maken we gebruik van zeer ervaren personeel, die ervoor zorgen dat de experimenten weinig complicaties kennen en goed uitgevoerd zullen worden.

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

Periprocurele pijnstilling en dagelijkse monitoring voor ongerief in de eerste week na experiment. Daarnaast houden we de totale experimentele periode zo kort mogelijk door naar de histologie te kijken zodra het effect van de behandeling zichtbaar is (na drie weken). Naast de benodigde pijnstilling zullen de dieren antibiotica ontvangen om de kans op infecties en het daarbij behorende lijden te minimaliseren.

## **Herhaling en duplicering**

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

X 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.

Vóór de experimenten zullen de dieren in groepen worden gehuisvest. Vanaf de eerste operatie zal het dier solitair gehuisvest worden i.v.m. orale medicatietoediening. Om het contact met andere varkens onder deze omstandigheden nog enigszins te onderhouden, zullen ze in dezelfde ruimte ondergebracht worden waar ze andere varkens wel nog kunnen horen, ruiken en zien.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.



Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Dieren zullen mogelijk kortadempig worden en tekenen van verminderde hartfunctie (oedeem, cyanose) vertonen. De kans hierop is echter klein gezien de positie van de laesies in de pulmonaalvenen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Misplaatste laesies waarbij het geleidingssysteem is beschadigd. Dit hebben wij echter in alle voorgaande experimenten nooit gezien.

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

Een goede definitie van het humane eindpunt moet voorkomen dat de schadelijke effecten disproportioneel groot worden en tot onverdraagzaam lijden leiden. Conventionele medicijnen zullen teveel interfereren met de studiemedicatie, dus dat zal niet mogelijk zijn. Eventueel zal pijnstilling gegeven worden en zal het varken zo comfortabel mogelijk (eten, goede houding) gemaakt worden.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Geen voedsel/vocht inname. Persistierende dyspnoe, tachypnoe, perifere cyanose, immobiliteit langer dan 36 uur postoperatief. Zichtbare pijn ondanks pijnbestrijding. De eerste 3 dagen na OK zal dagelijks door de onderzoeker of (bij afwezigheid van de onderzoeker) iemand anders van de experimentele cardiologie het dier beoordeeld worden.

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

Uit voorgaande experiment weten wij dat de kans op deze symptomen erg klein is (<3%). Er is tijdens meer dan 80 proeven geen HEP bereikt. Wel is er een maal een dier overleden tijdens de follow up periode, waarschijnlijk door een plotselinge hartritimestoornis.

### 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.

Proef 1: matig

Proef 2: terminaal

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Uitname van het hart voor histologische analyse van de laesies is het eindpunt van deze studie. Dit is niet verenigbaar met het 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.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

11500

1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.

Universitair Medisch Centrum Utrecht

1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer Type dierproef

3 Doorontwikkeling IRE

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Binnen dit onderzoek zijn wij voornemens een drietal proeven uit te voeren:

Proef 1. Hoog Frequente ablaties. De nu gebruikte effectieve IRE methode werkt op basis van gelijkstroom. Dit zorgt voor grote laesie zonder negatieve effecten op omliggende structuren. Een dergelijk grote gelijkstroom zorgt echter wel voor het samentrekken van grote lichaamsstructuren wat zorgt voor hetzelfde effect dat gezien wordt bij een defibrillatie. Daardoor is het in de toekomst nodig patiënten deze onder narcose te brengen. Momenteel doen wij onderzoek naar het gebruik van hoogfrequente wisselstromen in plaats van gelijkstroom, waarmee het probleem met de skeletspiercontracties kan worden

opgelost. Om dit te onderzoeken hebben wij een speciale generator laten bouwen welke met hoge nauwkeurigheid deze pulsen kan leveren. Bij reeds uitgevoerde onderzoeken zien wij positieve effecten, duidelijke laesies zonder de spiercontracties. Er zal echter nog meer onderzoek moeten worden gedaan naar bijvoorbeeld de te gebruiken frequentie, de gebruikte spanning en de pulsvormen.

Bij dit onderzoek brengen wij epicardiaal meerdere laesies aan waarbij deze parameters worden onderzocht. Drie weken later zullen de laesies histologisch worden geëvalueerd. Laesie diepte op histologie is de primaire uitkomst parameter.

Proef 2. Andere toepassingen. De planning van het project beschrijft een eerste onderzoek in de kliniek met deze methode op korte termijn (2015-2016). Het is aannemelijk dat er tijdens dit humane onderzoek vragen naar boven komen welke middels dierproef onderzoek beantwoord moeten worden. Daarnaast zijn wij gezien de goede resultaten van voorgaande experimenten ook op zoek naar andere toepassingen van de IRE techniek binnen de cardiologie. Een voorbeeld hiervan is epicardiale ablaties van het linker ventrikel, bijvoorbeeld voor VT-ablaties [1].

Daarom zouden wij tijdens deze proeven graag onderzoek doen naar mogelijk andere toepassingen binnen de cardiologie. Bij dit soort experimenten zullen wij middels een minimaal invasieve benadering een catheter ter plaatse brengen en de IRE afgeven. Lokaal worden dan de parameters gemeten om te bepalen of de energie goed is aangekomen. Drie weken later zullen deze parameters opnieuw worden gemeten middels een elektrofysiologisch onderzoek. Tevens zal het hart histologisch worden onderzocht na terminatie. De primaire uitkomst parameters zijn laesie diepte op histologie en elektrofysiologische parameters.

[1] Neven K, van Driel V, van Wessel H, et al. (2014) Safety and Feasibility of Closed Chest Epicardial Catheter Ablation Using Electroporation. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 7:913-919. doi: 10.1161/CIRCEP.114.001607

Proef 3. Laesievorming in de tijd. Een derde onderwerp van onderzoek is het precieze effect van de IRE op het weefsel. We weten dat de laesies groot genoeg zijn, maar we weten niet precies in welk tijdsbestek het hartweefsel dood gaat (uren/dagen). Daarom zijn we momenteel bezig dit tot in detail in kaart te brengen. Met de kennis uit deze proeven kunnen in de toekomst beter inschatten of bijvoorbeeld een pulmonaal vene isolatie kans heeft om toch weer te gaan lekken, wat betekent dat de procedure nogmaals uitgevoerd moet worden. In voorgaande onderzoeken hebben we vooral het eerst uur na IRE toediening nauwkeurig bekeken. Daarnaast hebben we uit langer lopende proeven kunnen bepalen hoe het weefsel zich, 8 uur, 3 weken en 3 maanden later heeft ontwikkeld. Hoe het precieze verloop van laesievorming tussen 8 uur en 3 weken ontwikkeld is nog onduidelijk. Wel is duidelijk dat dit de periode is waarin het weefsel dood gaat.

Tijdens deze onderzoeken proberen we die periode nauwkeuriger in kaart te brengen om zodoende beter te begrijpen waarom bepaalde delen van het weefsel zich soms herstellen. Bij deze proeven zullen we na een sternotomie onder anaesthesie een aantal laesies aanbrengen op het epicard met een speciaal daarvoor ontwikkeld device. Hiermee kunnen we de hoeveelheid energie en de richting daarvan nauwkeurig bepalen. 1 tot 7 dagen na deze therapie volgt terminatie en zullen we de laesies histologisch worden geanalyseerd. De primaire uitkomst parameters zijn dan de histologische uitkomsten, aanwezigheid van bepaalde cellen en de beschadiging van bepaalde cellen tevens zal indien mogelijk de laesiediepte worden bepaald.

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

Proef 1:

- Op dag 0 zullen onder anaesthesie na een sternotomie meerdere (3-4) laesies worden aangebracht met behulp van Hoog Frequent - IRE op het epicard.
- Op dag 2.1 zal na terminatie onder anaesthesie het hart worden uitgenomen om hieruit histologisch de laesie grootte van alle behandelingen te bepalen.

Na drie weken is het mogelijk histologisch duidelijk onderscheid te maken tussen gezond en behandeld weefsel. In een vroeger stadium is dit onderscheid soms lastig.

**Proef 2:**

- a. Op dag 0 zullen onder anaesthesie middels een minimaal invasieve methode (veneus dan wel subxiphoidaal dan wel video assisted transthoracic surgery (VATS)) meerdere (3-4) laesies worden aangebracht in of op het hart middels IRE.
- b. Op dag 21 zal na terminatie onder anaesthesie het hart worden uitgenomen om hieruit histologisch de laesie grootte van alle behandelingen te bepalen.

Na drie weken is het mogelijk histologisch duidelijk onderscheid te maken tussen gezond en behandeld weefsel. In een vroeger stadium is dit onderscheid soms lastig.

**Proef 3:**

- a. Op dag 0 zullen onder anaesthesie na een sternotomie meerdere (3-4) laesies worden aangebracht middels IRE op het epicard. Dit gebeurt met een speciaal daarvoor ontwikkeld device om meer controle te hebben over de IRE parameters.
- b. Later, op dag (tussen 1 - 7) zal na terminatie onder anaesthesie het hart worden uitgenomen voor histologisch onderzoek. Het interval zal hierbij de primaire te variëren variabele zijn.

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

In experiment 1 shocks met verschillende energieën afgegeven. Hierdoor worden in feite de verschillende groepen samengevoegd in 1 dier en kunnen we het aantal benodigde dieren verminderen. Wat betreft de statistiek kiezen we ervoor om de laesies binnen 1 dier direct met elkaar te vergelijken. Daarnaast kijken we naar variatie zoals we ook eerder hebben gezien tijdens vergelijkbare experimenten. We proberen om goed te poweren, want te weinig power levert uiteindelijk het nutteloos gebruik van dieren op, omdat je het effect niet eens zou hebben kunnen detecteren. Teveel dieren is onnodig en daarmee onwenselijk.

In experiment 2 zal het vooral gaan om de feasibility van een nieuwe methode aan te tonen. Hiervoor zijn vaak relatief weinig dieren nodig. We gebruiken de ervaringen met soortelijk experimenten om het benodigd aantal dieren laag te houden.

Daarnaast zullen we tijdens de duur van het onderzoek de variatie in de resultaten meten en deze meenemen in de daarop volgende experimenten. Bij een (door ons verwachte) dalende variatie per methode zullen er dus minder dieren nodig zijn.

**B. De dieren**

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

We zullen gebruik maken van landvarkens vanwege het feit dat deze dieren qua anatomie en (patho)fysiologie het meest op de mens gelijken. De landvarkens komen bij Van Beek (Lelystad) vandaan. Hiervoor kiezen we omdat we goede ervaring met deze diersoort hebben en qua methodologie op eerdere experimenten willen voortbouwen. Varkens zijn circa enkele maanden oud (60-75kg).

**Proef 1:**

In een voorgaand experiment in 3 dieren hebben we laesie dieptes gemeten van 2.0 en 2.7mm voor verschillende pulsvormen, bij beide groepen was de standaarddeviatie gemiddeld 0.5mm. Om met een zekerheid van minimaal 80% onderscheid te kunnen maken tussen deze groepen middels een gepaarde T-test zijn in totaal 10 dieren nodig voor een dergelijke experiment.

We gaan ervanuit dat we soortgelijke experimenten de komende 5 jaar 2 maal per jaar zullen moeten uitvoeren.

Er zijn voor dit soort experimenten dus de komende vijf jaar maximaal 5 jaar x 2 experimenten x 10 dieren = 100 dieren nodig.

Proef 2:

Het is niet mogelijk hier een powercalculatie uit te voeren. Maar ervaringen met soortgelijk onderzoek leert ons dat er voor een dergelijke proef 3-5 dieren nodig zijn. We verwachten dat dergelijk experimenten 1 maal per jaar zullen plaatsvinden.

Er zijn voor dit soort experimenten de komende vijf jaar maximaal 5 jaar x 1 experimenten x 5 dieren = 25 dieren nodig.

Proef 3:

Het is niet mogelijk hier een powercalculatie uit te voeren. Maar ervaringen met soortgelijk onderzoek leert ons dat er voor een dergelijke proef 3-5 dieren nodig zijn. We verwachten dat dergelijk experimenten 1 maal per jaar zullen plaatsvinden. We verwachten met maximaal 2 series de data te kunnen completeren.

Er zijn voor dit soort experimenten de komende vijf jaar maximaal 2 experimenten x 5 dieren = 10 dieren nodig.

In totaal zullen voor deze experimenten de komende 5 jaar maximaal  $100 + 25 + 10 = 135$  dieren nodig zijn.

Daarnaast zullen we tijdens de duur van het onderzoek de gemeten variatie in de resultaten meten en deze meenemen in de daarop volgende experimenten. Bij een (door ons verwachte) dalende variatie per methode zullen er dus minder dieren nodig zijn. Dit zullen we echter pas na de eerste proeven kunnen bepalen. Tevens is het vaak mogelijk proeven te combineren zodat er in totaal minder dieren nodig zijn. Dit geldt voor proeven 1 en 2. Indien bijvoorbeeld de locatie van experiment 2 niet dicht bij die van experiment 1 zit, dan is het mogelijk deze twee proeven te combineren. Het streven is het aantal dieren tot een minimum te beperken.

### 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.

Omdat we bij deze proeven de effecten op lange termijn bekijken is het onmogelijk deze proeven in vitro te testen. Echter hebben wij wel al van tevoren alle scenario's m.b.t. de electrode grootte en verschillende energieën met behulp van wiskundige modellen doorgerekend. Tevens worden alle gebruikte technieken eerst in dummy's getest. Omdat de proeven in deze exacte uitvoering zo zijn opgezet dat we de laesie diepte exact kunnen meten meten middels histologie, is het niet mogelijk deze in mensen te testen.

Door proeven te combineren zoals eerder beschreven proberen wij het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

Daarnaast maken we gebruik van zeer ervaren personeel, die ervoor zorgen dat de experimenten weinig complicaties kennen en goed uitgevoerd zullen worden.

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

Per procedurele pijnstilling en dagelijkse monitoring voor ongerief in de eerste week na experiment. Daarnaast houden we de totale experimentele periode zo kort mogelijk door naar de histologie te kijken zodra het effect van de behandeling zichtbaar is (na drie weken). Naast de benodigde pijnstilling zullen de dieren antibiotica ontvangen om de kans op infecties en het daarbij behorende lijden te minimaliseren.

#### **Herhaling en duplicering**

##### **E. Herhaling**

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

#### **Huisvesting en verzorging**

##### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

X 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.

Vóór de experimenten zullen de dieren in groepen worden gehuisvest. Vanaf de eerste operatie zal het dier solitair gehuisvest worden i.v.m. orale medicatietoediening en ter preventie van onnodige stress. Om het contact met andere varkens onder deze omstandigheden nog enigszins te onderhouden,

zullen ze in dezelfde ruimte ondergebracht worden waar ze andere varkens wel nog kunnen horen, ruiken en zien.

#### **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?

### **Ongeriefschatting/humane eindpunten**

#### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Dieren zullen mogelijk kortadempig worden en tekenen van verminderde hartfunctie (oedeem, cyanose) vertonen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De laesies op de linker kamer kunnen ervoor zorgen dat het hart op die plaats minder goed zal werken, hierdoor zal de totale functie van het hart mogelijk verminderen, maar de ervaring met dit soort experimenten leert dat dit geen hartfalen oplevert.

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

Een goede definitie van het humane eindpunt moet voorkomen dat de schadelijke effecten disproportioneel groot worden en tot onverdraagzaam lijden leiden. Conventionele medicijnen zullen teveel interfereren met de studiemedicatie, dus dat zal niet mogelijk zijn. Eventueel zal pijnstilling gegeven worden en zal het varken zo comfortabel mogelijk (eten, goede houding) gemaakt worden. **Omdat er mogelijk kans is op het optreden van hartritestroornissen zullen de dieren hiervoor antiaritmica krijgen toegediend.**

#### **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.

Geen voedsel/vocht inname. Persistierende dyspnoe, tachypnoe, perifere cyanose, immobiliteit langer dan 36 uur postoperatief. Zichtbare pijn ondanks pijnbestrijding. De eerste 3 dagen na OK zal dagelijks door de onderzoeker of (bij afwezigheid van de onderzoeker) iemand anders van de experimentele cardiologie het dier beoordeeld worden. **Anatomische variaties in bijvoorbeeld de pulmonaal venen zijn over het algemeen geen reden een proef niet uit te voeren. Het zou echter kunnen voorkomen dat een variatie zo extreem is dat de proef niet zal kunnen worden uitgevoerd. Dit zal dan gelden als humaan eindpunt.**

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.

Proef1: Ernstig (sternotomie)

Proef 2: Matig (minimaal invasief)

Proef 3: Ernstig (sternotomie)

#### Einde experiment

##### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Uitname van het hart voor histologische analyse van de laesies is het eindpunt van deze studie. Dit is niet verenigbaar met het 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.

Ja

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.532.019  
2. Titel van het project : ACDC – cardiale electroporatie ablaties  
3. Titel van de NTS : Behandeling van hartrimtestroonissen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 24-06-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 08-07-2015  
 anderszins behandeld: 21-07-2015 (emailronde)  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-07-2015 tot 21-07-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 04-08-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 14-07-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

Alle bijlagen

- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Epicardiale lesies maken in feite een klein lokaal myocardinfarct welke het risico vergroot op lethale hartritme stoornissen zoals kamerfibrilleren. Welke profylactische medicatie geeft U om eventuele uitval te voorkomen? De Dec adviseert u bij de schatting van de aantallen dieren rekening te houden met uitval.
- C, Hergebruik: U hebt de tweede vraag niet beantwoord. Graag alsnog doen.

- Datum antwoord: 21-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Alle bijlagen

- A, Bij de experimenten waarbij dit van toepassing is staat nu vermeld dat er antiaritmica zullen worden toegediend wanneer er kans bestaat op ritmestoornissen.
- C, In deze gevallen zal hergebruik plaatsvinden bij terminatie. Dit zal dus nooit het ongerief van het dier verhogen.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:
- Datum expert advies:
- Expert advies:

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

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

**C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het beter behandelen van hartritmestoornissen bij de mens. Hartritmestoornissen vormen een belangrijke oorzaak van ziekte en overlijden. De behandeling van hartritmestoornissen bestaat momenteel uit medicatie en/of Radio Frequente-ablatie, maar dit werkt vaak niet goed op de langere termijn en er is kans op complicaties. Om die reden is de, reeds bestaande, Direct Current-ablatietechniek aangepast en is de Irreversibele Electroporatie (IRE) ablatiemethode ontwikkeld. Door middel van deze translationele studie kan onderzocht worden of het toepassen van deze nieuwe IRE-ablatiemethode, een veilig toepasbare techniek is en op korte termijn (binnen één jaar) de translatie naar de kliniek kan maken.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
- De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd. Vanaf de eerste operatie zullen de dieren solitair gehuisvest worden i.v.m. orale medicatietoediening. De dieren zullen wel in dezelfde ruimte gehuisvest worden en kunnen elkaar dus wel horen, zien en ruiken.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief in bijlage 1 is voor ca. 57% van de dieren ingeschat als ernstig vanwege de sternotomie, het laten overleven van de dieren gedurende drie weken en het opnieuw onder (terminale) narcose brengen van de dieren en voor ca. 43% van de dieren als terminaal omdat de dieren niet bijkomen uit de anesthesie. Het ongerief in bijlage 2 is voor ca. 67% ingeschat als matig vanwege het uitvoeren van een Pulmonaal Venen Isolatie (PVI), het laten overleven van de dieren gedurende drie weken of 3 maanden en het opnieuw onder (terminale) narcose brengen van de dieren. Voor ca. 33% van de dieren is het ongerief ingeschat als terminaal omdat zij niet bijkomen uit de anesthesie. In de derde bijlage is voor ca. 81% van de dieren het ongerief ernstig vanwege de sternotomie en het laten overleven van de dieren variërend van één tot drie

weken en het opnieuw onder (terminal) narcose brengen van de dieren en voor ca. 19% van de dieren matig vanwege het onder narcose aanbrengen van meerdere leasies in of op het hart middels IRE, het laten overleven van de dieren gedurende drie weken en het opnieuw onder (terminale) narcose brengen van de dieren. Gezien de handelingen is de DEC van mening dat de ongeriefsinschattingen realistisch zijn.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. In dit project wordt onder andere gekeken naar de langetermijneffecten. Deze langetermijneffecten, en dan met name de fysiologische aspecten, zijn in vitro niet (goed) na te bootsen. Vanwege histologisch onderzoek van het hartweefsel en de risico's, is het niet mogelijk het onderzoek met mensen uit te voeren. Vooraf zijn, met behulp van wiskundige modellen, alle scenario's met betrekking tot de electrode grootte en de verschillende energieën doorgerekend en in vitro dan wel op dummy's getest.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. Er zullen zoveel mogelijk experimenten gecombineerd worden in één dier, zodat het aantal dieren dat nodig is tot een minimum beperkt blijft. Voor de terminale experimenten zullen, indien mogelijk, dieren uit andere experimenten gebruikt worden, zodat daar geen extra dieren voor gebruikt hoeven te worden. Bovenstaande maakt dat de DEC van mening is dat het maximaal aantal gebruikte dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dieproeven. Vanwege de aard van de experimenten worden de dieren tot drie dagen na operatie intensief gecontroleerd en zal adequate pijnbestrijding worden toegepast en humane eindpunten worden gehanteerd. Binnen de onderzoeksafdeling is voldoende ervaring met de beschreven experimenten, waardoor er veel expertise aanwezig is. Verwacht wordt dat er tijdens het experiment geen dieren dood zullen gaan of onnodig zullen lijden. Er wordt gebruik gemaakt van varkens omdat het varken qua anatomie en (patho)fysiologie het het meest vergelijkbaar is met dat van de mens, waardoor het mogelijk is de resultaten te vertalen naar de behandeling van mensen. Daarnaast zijn eerdere studies ook uitgevoerd in varkens, waardoor deze experimenten kunnen voortbouwen op dezelfde methodologie.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk het verbeteren van de behandeltechnieken om hartritmestoornissen tegen te gaan, substantieel is en op korte termijn de translatie van dit onderzoek naar de kliniek kan worden gemaakt. Als gevolg van de sternotomie en het uitvoeren van de Pulmonaal Venen Isolatie onder narcose en het laten overleven van de dieren dan wel terminale experimenten treedt weliswaar terminaal tot ernstig ongerief op, maar de DEC is van mening dat gekozen is voor de juiste onderzoeksstrategie en dat deze handelingen noodzakelijk zijn voor het bereiken van het gewenste doel. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin verdere in vitro of ex vivo alternatieven beschikbaar.

Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het ten hoogste ernstige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden. Zij acht gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015206

**Bijlagen**

2

Datum 07-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015206. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB000005267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 september 2015  
Geplande einddatum: 1 augustus 2020  
Titel project: ACDC-Electroporatie ablaties  
Titel niet-technische samenvatting: Ablaties van het hart  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

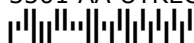
Naam:   
Functie:   
Plaats: Utecht  
Datum: 6 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015206

**Bijlagen**

2

Datum 07-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 7 augustus 2015

Vervaldatum: 6 september 2015

Factuurnummer: 201570206

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD115002015206 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015206

Datum 31 augustus 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 6 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "ACDC – Electroporatie ablaties" met aanvraagnummer AVD115002015206. 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.

U kunt met uw project "ACDC – Electroporatie ablaties" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2015 tot en met 1 augustus 2020.

Op grond van de Wet op de dierproeven is het mogelijk dat de CCD een projectvergunning voor dierproeven verleent met een (opschortende) voorwaarde. Een Beschrijving Dierproeven die op het moment van de vergunningverlening nog niet voldoende is uitgekristalliseerd, is hier een voorbeeld van. De opschortende voorwaarde die hieraan kan worden verbonden, is dat de aangevraagde dierproef, voordat deze dierproef wordt uitgevoerd, nog aan de CCD ter toetsing wordt voorgelegd.

De CCD oordeelt dat dit geldt voor dierproef 2 (Pulmonaal venen isolatie en contactmetingen) en dierproef 3 (Doorontwikkeling IRE). U kunt een nieuwe Beschrijving Dierproeven indienen als het meer concreet is welke vraagstukken, welke toepassingen en welke nieuwe technieken er onderzocht gaan worden. Deze dierproeven kunt u als wijziging indienen en mogen pas gestart worden na goedkeuring van de CCD.

### Beoordeling achteraf

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

### Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 4 augustus 2015. 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. Wel wordt het project gefaseerd vergund. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Bezwaar**

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

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

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

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

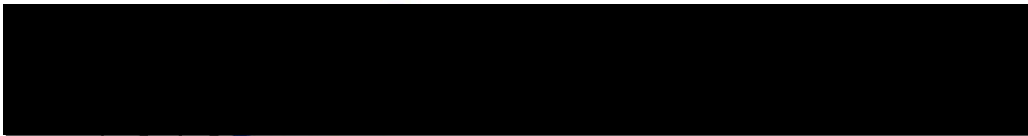
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2015 tot en met 1 augustus 2020, voor het project "ACDC – lectroporatie ablaties" met aanvraagnummer AVD115002015206, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 6 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 6 augustus 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 6 augustus 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 6 augustus 2015

### Dierproeven

| Naam dierproef                              | Diersoort                      | Aantal dieren | Ernst   | Voorwaarden   |
|---|--------------------------------|---------------|---------|---|
| Effecten van IRE parameters op laesiediepte | Varkens, Landvarkens, 60-75 kg | 175           | Ernstig |   |
| Pulmonaal venen isolatie en contactmetingen | Varkens, Landvarkens, 60-75 kg | 150           | Matig   | Als bekend is welke vraagstukken er n.a.v. dierproef 1 onderzocht gaan worden, kunt u een concretere beschrijving indienen bij de CCD als wijziging. Deze dierproef mag pas gestart worden na goedkeuring van de CCD. |
| Doorontwikkeling IRE                        | Varkens, Landvarkens, 60-75 kg | 135           | Ernstig | Als bekend is welke toepassingen en nieuwe technieken onderzocht gaan worden, kunt u een concretere beschrijving indienen bij de CCD als wijziging. Deze dierproef mag pas gestart worden na goedkeuring van de CCD.  |

**Datum**

31 augustus 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD115002015206

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2020 plaatsvinden.

**Voorwaarden**

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

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

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

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade



zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

#### **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. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk december 2020 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 van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

| Inventaris Wob-verzoek W16-04s |                                    |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                                    | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                           | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS 20151207</b>                |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier                  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                              | Projectvoorstel                    |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting oud   |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 4                              | Bijlage dierproeven 1              |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 5                              | Bijlage dierproeven 2 oud          |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 6                              | DEC-advies                         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                              | Ontvangstbevestiging               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 8                              | E-mailwisseling 29-9-2015          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | E-mailwisseling 14-10-2015         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                             | Niet-technische samenvatting nieuw | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 11                             | Bijlage dierproeven 2 nieuw        |                 |      | x      | x     |                   |        |        |      |
| 12                             | Advies aan CCD                     |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 13                             | Beschikking en vergunning          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |



04 SEP 2015

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

|     |   |   |
|-----|---|---|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 48500<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie NIZO food research<br>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED]<br>KvK-nummer 09139048<br>Straat en huisnummer Kernhemseweg 2<br>Postbus 20<br>Postcode en plaats 6710 BA Ede<br>IBAN NL30 RABO 0307043800 (BIC: RABONL2U)<br>Tenaamstelling van het rekeningnummer NIZO food research B.V. |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> |   |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.<br>Functie Project manager/Senior Scientist<br>Afdeling [REDACTED]<br>Telefoonnummer [REDACTED]<br>E-mailadres [REDACTED]  |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.<br>Functie Project manager/Senior Scientist<br>Afdeling [REDACTED]<br>Telefoonnummer [REDACTED]<br>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 01 - 08 - 2015
- Einddatum 31 - 07 - 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Kwaliteit van nieuwe eiwitten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het meten van de voedingswaarde van nieuwe eiwitten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC Dierexperimentencommissie Wageningen Universiteit
- Postadres Afdeling Corporate Governance & Legal Services Postbus 9101 6700 HB Wageningen
- E-mailadres DEC@wur.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 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
- Al uitgebracht advies van de Dierexperimentencommissie Wageningen


## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

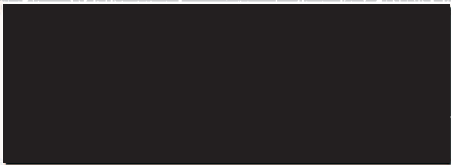
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie Project manager

Plaats Ede

Datum 03 - 09 - 2015

Handtekening 



## Format

### Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.  Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*  Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Vanwege de groei van de wereldbevolking neemt de wereldwijde behoefte aan voedsel toe.

Eiwitten maken een belangrijk deel uit van de voedingsstoffen die voor de mens belangrijk zijn. Van veel eiwitten of producten die specifieke eiwitten bevatten is al bekend dat ze een goede voedingswaarde voor de mens hebben. Deze voedingswaarde hangt samen met de mate waarin het eiwit de voor de mens essentiële aminozuren bevat, maar ook de mate waarin het eiwit in de maag en darmen kan worden afgebroken en opgenomen.

Om aan de toenemende vraag naar eiwitten te voldoen, zijn bedrijven op zoek naar nieuwe eiwitbronnen, of naar aangepaste samenstellingen van producten waar eiwit in verwerkt is. Meestal betreft dat eiwitten uit nieuwe eiwitbronnen, zoals insecten, gras, algen etc. Soms betreft het een eiwit in een product. Het gaat dan meestal om babyvoeding waarin een ander eiwit dan koemelkeiwit wordt gebruikt. Voordat zij deze producten op de markt mogen brengen en daarbij de daaraan gekoppelde voedingswaarde mogen vermelden, moet eerst aangetoond worden of een dergelijk nieuw eiwit of product voldoende voedingswaarde heeft. De voedingswaarde moet dan worden vergeleken met bekende eiwitten of producten waarin bekende eiwitten zitten. Hiervoor moet een dossier worden opgebouwd dat beoordeeld wordt door de daarvoor bevoegde autoriteiten. Voor de Europese markt betreft dat de European Food Safety Authority (EFSA), en voor de Amerikaanse markt de US Food and Drug Administration (FDA). Onderdeel van deze dossiers zijn dierstudies die de kwaliteit van de eiwitten of producten onderbouwen.

Er zijn twee rattenmodellen beschreven die voor deze dossiers als internationale standaard gevolgd dienen te worden om de kwaliteit van eiwitten te onderbouwen. Deze modellen onderbouwen verschillende aspecten van de kwaliteit van eiwitten, zoals groei in jonge dieren (Protein Efficiency Ratio, PER) en verteerbaarheid (Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score, PDCAAS). De protocollen hiervoor zijn beschreven in de Official Methods van de Association of Analytical Communities. Deze diermodellen zijn niet in alle opzichten direct te vertalen naar de mens, maar geven door de vergelijking met caseïne wel een belangrijk eerste inzicht in hoe de kwaliteit van nieuwe eiwitten zich verhoudt tot de kwaliteit van eiwitten waarvan de kwaliteit al bekend is.

In het huidige project worden de twee hierboven genoemde protocollen gebruikt om de eiwitkwaliteit te kunnen meten voor klanten die nieuwe eiwitten of producten met eiwit op de markt willen brengen en daarvoor de gegevens uit dierstudies moeten presenteren in hun dossier.

---

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is om de kwaliteit van nieuwe eiwitten of nieuwe producten waar eiwitten in zijn verwerkt te meten. Bedrijven die deze eiwitten of producten maken hebben deze gegevens uit dierstudies nodig als onderdeel van het dossier waarmee de voedingswaarde van het eiwit of het product door de bevoegde autoriteiten vast wordt gesteld. Pas wanneer de autoriteiten dit hebben goedgekeurd kunnen bedrijven de voedingswaarde op hun verpakkingen vermelden.

Het project is haalbaar omdat het diermodel eenvoudig van opzet is en de uitkomst een rechtstreekse maat is voor de kwaliteit van een eiwit in vergelijking met een daarvoor vastgestelde standaard.

---

### 3.3 Belang

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

---

Vanwege de groei van de wereldbevolking neemt de wereldwijde behoefte aan voedsel toe. Eiwitten maken een belangrijk deel uit van de voedingsstoffen die voor de mens belangrijk zijn. Door de toenemende behoefte aan voedsel en voeding met een goede voedingswaarde, is het voor bedrijven van belang om nieuwe eiwitten te produceren, of nieuwe producten te ontwikkelen die aan deze behoefte tegemoet komen. Omdat het van belang is dat voeding een goede voedingswaarde heeft, is het noodzakelijk om van deze nieuwe eiwitten of producten aan te tonen wat de voedingswaarde is. Onderdeel daarvan is het aantonen van de kwaliteit van het eiwit of het product waar eiwit in verwerkt is.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

NIZO is een contract research organisatie. Dat betekent dat klanten met onderzoeksvragen bij NIZO komen, waarbij NIZO vervolgens in een project deze vragen helpt beantwoorden.

Voor vragen over eiwit kwaliteit zal het daarom altijd gaan om op zichzelf staande vragen van verschillende klanten, die voor nieuwe eiwitten of nieuwe producten een dossier moeten opbouwen om de voedingswaarde en eiwit kwaliteit aan te tonen. Deze vragen worden door NIZO in afzonderlijke projecten 1-op-1 met de klant uitgewerkt.

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

Voor eiwit kwaliteit zijn twee typen proeven beschreven in de Official Methods van de AOAC: de PER (gericht op groei) en de PDCAAS (gericht op verteerbaarheid).

PER: Wanneer een bedrijf een nieuw eiwit of product ontwikkelt met het oog op zuigelingen voeding, dan wordt door autoriteiten meestal gevraagd om een PER studie uit te voeren. Deze studie meet de groei van jonge ratten, gerelateerd aan de hoeveelheid eiwit die ze via de voeding binnen krijgen.

PDCAAS: Wanneer een bedrijf een nieuw eiwit of product ontwikkelt met het oog op voeding voor alle leeftijden, dan wordt door autoriteiten gevraagd om een PDCAAS studie uit te voeren. Deze studie meet de hoeveelheid eiwit die door groeiende ratten in het lichaam wordt opgenomen (en dus is afgebroken in het maag-darmstelsel), gerelateerd aan de hoeveelheid eiwit die ze via de voeding binnen krijgen. Binnen deze studieopzet kan ook de zogenaamde biologische waarde van eiwitten meegenomen worden als aanvullende parameter van eiwit kwaliteit.

Als in één van beide studies alleen een eiwit wordt getest, wordt een basisvoeding gebruikt zoals beschreven in het AOAC protocol, waar het eiwit aan wordt toegevoegd. Dit wordt dan vergeleken met eenzelfde basisvoeding waaraan een referentie-eiwit wordt toegevoegd (caseïne), en in het geval van de PDCAAS ook met een eiwitvrije groep. Als het gaat om een product waar een nieuw eiwit aan wordt toegevoegd, zoals een baby voeding, moet voor de controlegroep de basisvoeding van dit product (dat bestaat uit bv lactose, vitamines en mineralen) in dezelfde samenstelling worden gebruikt, waar het referentie-eiwit aan wordt toegevoegd in plaats van het te testen eiwit. In dit geval zal dus worden afgeweken van de basisvoeding zoals beschreven in de AOAC protocollen, om de bijdrage van het eiwit te kunnen onderscheiden van de bijdrage van de overige nutriënten. Deze afwijking van de AOAC protocollen is een overeengekomen afspraak van de regelgevingsinstanties.

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

Zie punt 3.4.1: de verschillende proeven die gedaan worden door NIZO hebben geen onderlinge samenhang, omdat ze op een 1-op-1 basis voor klanten worden uitgevoerd. Wel streven we bij de PDCAAS, indien dit mogelijk is gezien de vraag naar deze proeven, naar een combinatie van proeven om zo te besparen op het aantal dieren dat als controlegroep nodig is.

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



| Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Protein Efficiency Ratio (PER)                            |
| 2          | Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) |
| 3          |   |
| 4          |   |
| 5          |   |
| 6          |   |
| 7          |   |
| 8          |   |
| 9          |   |
| 10         |   |



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project    | Het meten van de voedingswaarde van nieuwe eiwitten.<br><br>Aanvraagnummer: AVD485002015207 |
| 1.2 Looptijd van het project | 01-08-2015 tot 31-07-2020   |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Eiwit, voedingswaarde, kwaliteit  |

## 2 Categorie van het project

|  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.     | <input type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek   |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek   |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie                                    |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

## 3 Projectbeschrijving

|   |  |
|---|--|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Eiwitten zijn belangrijke voedingsstoffen voor de mens, die gebruikt worden voor de opbouw van bijvoorbeeld spieren in het lichaam. Van veel eiwitten is al bekend dat ze een goede voedingswaarde voor de mens hebben. Deze eiwitten worden ook wel eiwitten met een 'goede kwaliteit' genoemd. Omdat er in de wereld steeds meer voedsel nodig is, en dus steeds meer eiwit, zal er een tekort gaan ontstaan aan eiwitten met een bekende voedingswaarde. Om toch genoeg voedingseiwitten op de markt te brengen zijn bedrijven op zoek naar nieuwe eiwit bronnen. Voordat een bedrijf op het etiket de voedingswaarde van een eiwit mag vermelden, moet het bedrijf eerst laten zien dat zo'n nieuw eiwit een goede voedingswaarde heeft (eiwit |
|---|--|

kwaliteit). Dit is een eis die door de wereld gezondheidsorganisatie (WHO) wordt gesteld. De EFSA in Europa en de FDA in de Verenigde Staten zijn de overheidsorganisaties die beoordelen of een bedrijf daarvoor genoeg bewijs heeft. De WHO heeft vastgesteld dat dit moet worden aangetoond door de eiwitten aan jonge proefdieren te geven, en de groei en de opname van het eiwit door de proefdieren te vergelijken met een bekend eiwit.

- |     |   |   |
|-----|---|---|
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Nieuwe eiwitten zullen getest worden op hun voedingswaarde. Als een eiwit een goede kwaliteit heeft, kan het gebruikt worden om bij te dragen aan voldoende gezond voedsel voor de groeiende wereldbevolking.   |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Jonge ratten worden gebruikt, zodat je goed kan meten of ze genoeg eiwit opnemen en goed groeien.<br>In 5 jaar tijd worden maximaal 248 ratten gebruikt.  |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?                                     | De jonge ratten moeten tijdens het onderzoek alleen in een kooi zitten. Meestal is dat een gewone kooi, maar soms wordt een kooi gebruikt met een rooster op de bodem om urine en feces te kunnen verzamelen. Jonge ratten zullen stress voelen als ze alleen in een kooi zitten. In sommige proeven zijn er ook dieren die geen eiwit in hun voer krijgen. Deze dieren zullen afvallen, waardoor ze zich minder goed zullen voelen. De dieren moeten soms gewogen worden. Dit zorgt voor stress. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | De ernst van de negatieve gevolgen van de proeven is matig.   |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | Na afloop van de proeven worden de dieren gedood.   |

## 4 Drie V's

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 4.1 | <b>Vervanging</b><br>Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. | Deze dierproeven worden vereist door de overheidsorganisaties die beoordelen of een bedrijf genoeg bewijs heeft aangeleverd dat een nieuw eiwit voldoende voedingswaarde heeft. Het beoordelen of een eiwit echt bijdraagt aan groei en opname in het lichaam kan het beste gemeten worden in jonge mensen of dieren. Als eiwitten niet voldoende opgenomen worden zullen ze onvoldoende groei geven. Het is daarom ethisch niet verantwoord om deze nieuwe eiwitten direct in jonge kinderen te testen. Daarom is vastgesteld dat als tussenstap een dierproef met jonge dieren uitgevoerd moet worden. |
| 4.2 | <b>Vermindering</b><br>Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.   | Het aantal dieren dat gebruikt wordt is het aantal dat volgens voorgeschreven protocollen nodig is. Waar mogelijk zal geprobeerd worden om binnen een proef meerdere eiwitten tegelijk te testen, zodat je maar één keer een controle groep hoeft mee te nemen.  |

#### 4.3 **Verfijning**

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

Er worden ratten gebruikt omdat dit volgens het voorschrift gedaan moet worden. Het is een diersoort waarin je op een makkelijke manier kan meten of de dieren goed groeien en hoeveel ze eten.

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

Er worden speeltjes in de kooi gelegd om het voor de dieren minder vervelend te maken dat ze alleen in de kooi zitten. De dieren kunnen elkaar ook horen en ruiken, omdat de kooien in dezelfde ruimte staan.

## **5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



# Bijlage Beschrijving dierproeven

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

## 1 Algemene gegevens

|     |  |                    |                                |
|-----|--|--------------------|--------------------------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 48500              |                                |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | NIZO food research |                                |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer         | Type dierproef                 |
|     |  | 1                  | Protein Efficiency Ratio (PER) |

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

## 2 Beschrijving dierproeven

### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimentele strategie voor een PER studie is vastgelegd in de Official Methods van de AOAC, protocol nummer 960.48. De groei van jonge ratten wordt gedurende 28 dagen gemeten. Daarnaast wordt de hoeveelheid voerinnname (en daarmee de hoeveelheid eiwitinname) gemeten. De groei van de dieren wordt gerelateerd aan de eiwitinname.

Primaire uitkomsten:

PER = gewichtstoename/eiwitinname

Relatieve PER = (PER van het testdieet/PER van het controle(caseïne)dieet) \* 100%

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 experimentele strategie voor een PER studie is vastgelegd in de Official Methods van de AOAC, protocol nummer 960.48:

Per dieetgroep zijn 10 dieren nodig. De dieren moeten bij binnenkomst 3-4 weken oud zijn, en worden na binnenkomst 3-6 dagen op een regulier dieet in groepen gehuisvest om te acclimatiseren. Een acclimatisatieperiode van 6 dagen wordt nagestreefd.

Daarna worden de dieren gedurende 28 dagen individueel gehuisvest. Dit is van belang omdat per dier de eiwit inname gerelateerd moet worden aan de groei van het dier. Omdat alleen groei wordt gemeten, en geen materiaal van de dieren wordt verzameld, vindt huisvesting plaats in gewone kooien (op bedding, niet op roosterbodem), waarbij een voertunnel wordt gebruikt om de voer inname te kunnen meten. Water en voer zijn ad libitum beschikbaar voor de dieren.

De hoeveelheid voer inname wordt bepaald door de hoeveelheid overblijvend voer te wegen. De dieren worden minimaal 1x en maximaal 2x per week gewogen.

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

Het volgens de Official Methods van de AOAC voorgeschreven aantal dieren per groep is 10. Hiervoor wordt in het protocol geen verdere onderbouwing gegeven. Dit protocol is internationaal vastgesteld, en is gebaseerd op studies uit het verleden waarin naar eiwit-kwaliteit gekeken is met deze opzet. Vanwege de regelgeving wordt dit aantal als minimaal benodigd aantal gehanteerd binnen deze projecten. Omdat er geen grote belastende of levensbedreigende handelingen worden verricht, hoeven er geen extra dieren in de studie opgenomen te worden om te corrigeren voor uitval.

## B. De dieren

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

Mannelijke gespeende ratten van 3-4 weken oud (specified-pathogen free) worden gebruikt. Dieren van hetzelfde geslacht zijn nodig om de spreiding minimaal te houden. De internationale richtlijnen schrijven voor dat met mannelijke ratten gewerkt dient te worden. De soort die hiervoor door NIZO wordt gebruikt is Wistar Unilever.

De dieren moeten jong zijn omdat ze dan nog volop groeien, en groei de uitkomstmaat van deze proeven is. Daarmee wordt de vertaalslag naar zuigelingen gemaakt.

Per dieetgroep zijn 10 dieren nodig. Bij een gemiddelde proef zullen 2 eiwitten getest worden ten opzichte van een controlegroep. Er zijn dus 3 groepen nodig, dus in totaal 30 dieren. We verwachten maximaal 1 klantvraag per 1-2 jaar. Voor 5 jaar betekent dit een schatting 4 proeven met in totaal maximaal 120 proefdieren.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging door bijvoorbeeld een in vitro systeem is verworpen omdat de autoriteiten vragen om het meten van eiwitkwaliteit in een dierstudie. Dit heeft te maken met het feit dat er geen goed in vitro systeem of ex vivo systeem bestaat voor bestudering van eiwit kwaliteit.

Vermindering van het aantal proefdieren: door het toepassen van de volgens de richtlijnen vereiste minimale groeps grootte (minimaal 10 dieren per dieetgroep). Er wordt voor gekozen geen extra dieren te includeren om eventuele drop-outs te vervangen. Waar mogelijk kunnen testen van meerdere eiwitten worden gecombineerd, zodat er minder controlegroepen nodig zijn.

Voor het accuraat meten van de voerinname is, zoals in het AOAC protocol voorgeschreven, individuele huisvesting noodzakelijk. **Wel wordt er voor zorggedragen dat de dieren niet langer dan nodig individueel worden gehuisvest.** Vanwege de vereiste proefopzet is dit de maximaal haalbare verfijning.

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

Het wegen van de dieren geeft enige vorm van stress. Dit wordt door ervaren proefdierverzorgers gedaan om de stress tot een minimum te beperken.

Ook het individueel huisvesten is voor de proefdieren minder gerieflijk dan groepshuisvesting. Om hieraan tegemoet te komen wordt niet-eetbare kooiverrijking toegepast. Ook zullen de dieren elkaar kunnen horen en ruiken.

Van de proefopzet zijn geen specifieke milieueffecten te verwachten. Afvalverwerking van de kooi-inhoud en kadavers wordt volgens richtlijnen bij de proefdierfaciliteiten uitgevoerd om eventuele milieueffecten 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.

Wanneer een klant met een verzoek voor een PER studie naar NIZO komt wordt besproken om welk eiwit of product het gaat, en wat de reden is waarom de klant een PER studie wil laten uitvoeren. Er wordt bovendien nagegaan of er eerdere (vergelijkbare) studies zijn uitgevoerd. Omdat het vrijwel altijd gaat om nieuwe eiwitten en producten waarin eiwitten verwerkt zijn, is de kans op duplicering minimaal.

Hierbij zal in de beschikbare literatuur en op internet gecheckt (Pubmed, Google) worden of een dergelijke studie eerder is gepubliceerd. Omdat er echter geen verplichting is om gegevens uit dergelijke studies publiek openbaar te maken, betekent het dat deze check beperkt wordt door datgene wat publiekelijk toegankelijk is.

De vraag om een PER studie te laten doen is meestal gedreven door eisen vanuit de autoriteiten. Wanneer er (nog) geen wettelijke eis aan ten grondslag ligt, zal NIZO in principe niet tweemaal dezelfde proef doen wanneer het eiwit dat getest moet worden identiek is. Het is echter bekend dat eiwitten die op verschillende manieren gezuiverd of opgewerkt worden wel een verschillende kwaliteit kunnen hebben. Dus wanneer een klant een eiwitsoort wil laten testen die al eerder in een dergelijke proef getest is, zal NIZO controleren of de bron, zuivering of opwerking van het eiwit reden geeft om deze proef uit te voeren. In overleg met de klant zal dan besproken worden of een proef noodzakelijk is of niet.

## 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.

Dieren worden individueel gehuisvest terwijl groepshuisvesting de dieren meer gerief geeft. Dit is echter noodzakelijk om de individuele voedsel inname te kunnen correleren aan de individuele groei van de dieren.

Om hieraan tegemoet te komen wordt kooiverrijking toegepast.

### 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?

Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Regelmatig wegen en individuele huisvesting. Wanneer een eiwit niet in alle behoeften voorziet zou mogelijk ook ondervoeding kunnen ontstaan.

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

De dieren kunnen elkaar horen en ruiken, en er wordt kooiverrijking toegepast.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er kunnen mogelijk darmproblemen ontstaan vanwege eventuele antinutritionele factoren uit de eiwitbron. Ook zou er ondervoeding kunnen optreden wanneer de dieren bv het voer weigeren of het eiwit onvoldoende voedingswaarde heeft.

Criteria die gehanteerd zullen worden zijn:

1. Als het gewichtsverlies meer dan 20% groter is dan het gemiddelde van de diëetgroep waarin het dier zich bevindt, of een dier meer dan 20% van zijn eigen gewicht verliest ten opzichte van de voorgaande meting (uitgaande van 2-wekelijkse meting).
2. Als het dier op twee opeenvolgende dagen niet heeft gegeten heeft.

De beslissing om een dier uit de proef te halen zal in overleg met de biotechnicus worden genomen.

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

Op grond van onze ervaringen uit het verleden schatten we dit percentage op 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.



Vanwege de individuele huisvesting van jonge dieren gedurende 4 weken, worden de negatieve effecten geassocieerd als:

Matig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren zijn door het specifieke dieet niet geschikt om voor andere proeven gebruikt te worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

|     |   |                    |   |
|-----|---|--------------------|---|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 48500              |   |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                              | NIZO food research |   |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                                  | Volgnummer         | Type dierproef  |
|     | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 2                  | Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimentele strategie voor een PDCAAS studie is vastgelegd in de Official Methods van de AOAC, protocol nummer 991.29. Jonge ratten verblijven gedurende 9 dagen in een metabolisme kooi. Ze krijgen een dieet met het eiwit waarvan de kwaliteit bepaald moet worden. Het dieet is beperkt tot 15 gram per dag. Gedurende de eerste dagen is dit meer dan de ad libitum opname, aan het einde van de 9 dagen is dit ca. 95% van de ad libitum opname. Overblijvend voer wordt gewogen en feces worden verzameld. Eventueel kan ook urine verzameld worden. Stikstof in de feces (en evt urine) wordt gemeten als maat voor de hoeveelheid eiwit die niet wordt opgenomen. Als controle wordt een groep meegenomen die een eiwitvrij dieet krijgt. De feces van deze groep geven de waarde voor het endogene stikstofverlies. Soms wordt een controlegroep meegenomen die caseïne krijgt als referentie eiwit.

Primaire uitkomsten zijn:

True digestibility (TD%): afbreekbaarheid van eiwit gecorrigeerd voor endogene stikstof.

Apparent digestibility (AD%): afbreekbaarheid van eiwit niet gecorrigeerd voor endogene stikstof → dit geeft een onderschatting van de afbreekbaarheid.

Net Protein Utilization (NPU) en Biological value (BV): wanneer ook stikstof in de urine wordt gemeten, kan de NPU en BV berekend worden: NPU is het percentage ingenomen stikstof dat in het lichaam is opgenomen, en de BV geeft het percentage van het geabsorbeerde stikstof dat in het lichaam is opgenomen. De BV wordt berekend als  $NPU \times TD\%$ .

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 experimentele strategie voor een PDCAAS studie is vastgelegd in de Official Methods van de AOAC, protocol nummer 991.29:

Per dieetgroep zijn 8 dieren nodig. De dieren moeten bij binnenkomst 50-70 g wegen (ongeveer 3 weken oud), en moeten na binnenkomst 2-7 dagen op een regulier dieet (gemalen chow) in groepen gehuisvest om te acclimatiseren. Een acclimatisatieperiode van 7 dagen wordt nagestreefd.

Daarna worden de dieren gedurende 9 dagen individueel gehuisvest in metabolisme kooien (dag 1-4 als run-in periode voor het dieet, dag 5-9 als meet-dagen). Huisvesting in metabolisme kooien is van belang omdat per dier de voer/eiwit inname gemeten moet worden, en de feces (en urine) van elk dier verzameld moet worden van dag 5-9. De eiwitinname moet gerelateerd worden aan de stikstof in feces (en urine) van hetzelfde dier. Water is ad libitum beschikbaar voor de dieren. Voer is beperkt tot 15 gram per dag. De hoeveelheid voerinnname wordt bepaald door de hoeveelheid overblijvend voer te wegen.

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

Het volgens de Official Methods van de AOAC voorgeschreven aantal dieren per groep is 8. Dit protocol is internationaal vastgesteld, en is gebaseerd op studies uit het verleden waarin naar eiwitkwaliteit gekeken is met deze opzet. Vanwege de regelgeving wordt dit aantal als minimaal benodigd aantal gehanteerd binnen dit project. Omdat er geen grote belastende of levensbedreigende handelingen worden verricht, hoeven er geen extra dieren in de studie opgenomen te worden om te corrigeren voor uitval.

## **B. De dieren**

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

Mannelijke gespeende ratten worden gebruikt.

Dieren van hetzelfde geslacht zijn nodig om de spreiding minimaal te houden. De internationale richtlijnen schrijven voor dat met mannelijke ratten gewerkt dient te worden.

De soort die hiervoor door NIZO wordt gebruikt is Wistar Unilever. Dit is een veel gebruikte rattensoort die geschikt is voor dieet studies.

De dieren moeten jong zijn omdat ze dan nog volop groeien, en het eiwit in de voeding daarom volop benut wordt. Daardoor wordt een redelijke inschatting verkregen van de verteerbaarheid en opname van het eiwit.

Per dieetgroep zijn 8 dieren nodig. Bij een gemiddelde proef zullen 2 eiwitten getest worden, en worden 2 controlegroepen gebruikt (een referentie eiwit en een eiwit-vrije groep). Er zijn dus 4 groepen nodig, dus in totaal 32 dieren. We verwachten maximaal 1 klantvraag per 1-2 jaar. Over een periode van 5 jaar betekent dit een schatting van maximaal 128 proefdieren.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

Vervanging door bijvoorbeeld een in vitro systeem is verworpen omdat de autoriteiten vragen om het meten van eiwit kwaliteit in een dierstudie. Dit heeft te maken met het feit dat er geen goed in vitro systeem of ex vivo systeem bestaat voor bestudering van eiwitkwaliteit.

Vermindering van het aantal proefdieren: door het toepassen van de volgens de richtlijnen vereiste minimale groeps grootte (minimaal 8 dieren per dieetgroep). Er wordt voor gekozen geen extra dieren te includeren om eventuele drop-outs te vervangen.

Voor het accuraat meten van de voerinname en voor het individueel verzamelen van feces (en urine) is, zoals in het AOAC protocol voorgeschreven, individuele huisvesting noodzakelijk in metabolisme kooien. Wel wordt er voor zorg gedragen dat de dieren niet langer dan nodig individueel worden gehuisvest (alleen tijdens de 9 dagen waarop het dieet wordt gegeven). Vanwege het inzetten van een groep die een eiwitvrij dieet krijgt, en daardoor extra ongerief ervaart, streeft NIZO ernaar om, wanneer dit mogelijk is, meerdere eiwitten tegelijk binnen één proef te analyseren. Dan zijn de controle groepen slechts eenmaal nodig, om de PDCAAS waarde van meerdere eiwitten tegelijk te bepalen. Dit vermindert het aantal benodigde dieren, en vermindert ook het ongerief. Vanwege de vereiste proefopzet is dit de maximaal haalbare verfijning.

Historische data zijn niet beschikbaar voor de eiwitvrije groep. Deze gegevens worden niet in publicaties vermeld. NIZO zal, waar dat mogelijk is, aan de opdrachtgever vragen om bij de autoriteiten die de proef vereisen het verzoek neer te leggen of NIZO gebruik mag maken van de eigen historische data. Wanneer de autoriteiten daarmee akkoord gaan, kan de eiwitvrije groep uit de proef worden weggelaten.

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 proefdieren die gedurende 9 dagen een eiwitvrij dieet krijgen, ervaren wel ongerief, omdat er gewicht-/spierverlies optreedt. Het is echter gebleken dat de dieren ondanks dit gewichts-/spierverlies wel levendig blijven. Tijdens de proef zal dit samen met de dierdeskundige gevolgd worden.

NIZO zal in contact met de opdrachtgever bespreken of bij de beoordelende autoriteiten verzocht kan worden om de eiwitvrije groep weg te laten en gebruik te maken van de historische data die NIZO heeft.

Het individueel huisvesten in metabolismekooien is voor de jonge proefdieren ongerieflijk. Om hieraan tegemoet te komen wordt kooiverrijking toegepast die het verzamelen van urine en feces niet verhindert en die geen lawaai veroorzaakt waardoor de dieren gestrest zouden kunnen raken.

Van de proefopzet zijn geen specifieke milieueffecten te verwachten. Afvalverwerking van de kooi inhoud en kadavers wordt volgens richtlijnen bij de proefdierfaciliteiten uitgevoerd om eventuele milieueffecten 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.

Wanneer een klant met een verzoek voor een PDCAAS studie naar NIZO komt wordt besproken om welk eiwit of product het gaat, en wat de reden is waarom de klant een PDCAAS studie wil laten uitvoeren. Er wordt bovendien nagegaan of er eerdere (vergelijkbare) studies zijn uitgevoerd. Omdat het vrijwel altijd gaat om nieuwe eiwitten en producten waarin eiwitten verwerkt zijn, is de kans op duplicering minimaal.

Hierbij zal in de beschikbare literatuur en op internet gecheckt worden of een dergelijke studie eerder is gepubliceerd (Pubmed, Google). Omdat er echter geen verplichting is om gegevens uit

dergelijke studies publiek openbaar te maken, betekent het dat deze check beperkt wordt door datgene wat publiek vindbaar is.

De vraag om een PDCAAS studie te laten doen is meestal gedreven door eisen vanuit de autoriteiten. Wanneer er (nog) geen wettelijke eis aan ten grondslag ligt, zal NIZO in principe niet tweemaal dezelfde proef doen wanneer het eiwit dat getest moet worden identiek is. Het is echter bekend dat eiwitten die op verschillende manieren gezuiverd of opgewerkt worden wel een verschillende kwaliteit kunnen hebben. Dus wanneer een klant een eiwitsoort wil laten testen dat al eerder in een dergelijke proef getest is, zal NIZO controleren of de bron, zuivering of opwerking van het eiwit reden geeft om deze proef uit te voeren. In overleg met de klant zal dan besproken worden of een proef noodzakelijk is of niet.

## 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 in metabolismekooien, terwijl groepshuisvesting in reguliere kooien de dieren meer gerief geeft. Dit is echter noodzakelijk om de feces (en urine) individueel te kunnen verzamelen, en de stikstof in deze samples aan de individuele voedsel inname te kunnen correleren.

Om hieraan tegemoet te komen wordt kooiverrijking toegepast die geen lawaai veroorzaakt waardoor de dieren gestrest zouden kunnen raken.

De controlegroep die een eiwit-vrij dieet krijgt wordt niet conform de normen gevoerd. Van de norm wordt afgeweken omdat een endogene metabole waarde verkregen moet worden voor het berekenen van de werkelijke verteerbaarheid van een eiwit (True Digestibility).

### 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?

In de controlegroep die een eiwitvrij dieet krijgt, zal gewichts-/spierverlies optreden. Of daarnaast ook organen worden aangetast is aan de buitenkant niet zichtbaar, en is in de literatuur niet gerapporteerd. Gedurende de negen dagen van de studie blijven de dieren levendig, wat suggereert dat er geen grote afwijkingen in de normale fysiologie en metabolisme optreden.

Verder is de huisvesting in metabolismekooien een aantasting van het welzijn.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak van gewichts-/spierverlies is dat er geen eiwit in de voeding van de controlegroep zit (dosering koolhydraten, vet, vezels, vitaminen en mineralen voldoen aan richtlijnen), waardoor onvoldoende bouwstoffen beschikbaar zijn voor het in stand houden en opbouwen van de spieren.

Verblijf in metabolismekooien is een aantasting van welzijn omdat de dieren individueel gehuisvest worden op een roosterbodem.

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

De studie heeft voor een voedingsproef een relatief korte duur (9 dagen), waardoor de periode van het ongerief beperkt blijft. Vanwege het gewichtsverlies zal de temperatuur in de kamer iets verhoogd worden. Ook zullen de dieren dagelijks gecontroleerd worden op levendigheid. Wanneer de dieren hun levendigheid verliezen zal met de dierdeskundige overlegd worden of de proef moet worden afgebroken. Het gevolg hiervan is dat de hele proef niet meer geïnterpreteerd kan worden, waardoor de belasting voor alle dieren nutteloos is geweest. Dit belang zal meegenomen worden in de afweging voor het wel of niet afbreken van de proef. In de meest recente studie bleken de dieren voldoende levendig te blijven om te besluiten de proef niet voortijdig te beëindigen.

De dieren verblijven in dezelfde ruimte en kunnen elkaar dus wel horen en ruiken. Bovendien wordt kooiverrijking toegepast.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er kunnen mogelijk darmproblemen ontstaan vanwege eventuele antinutritionele factoren uit de eiwitbron. Ook zou er ondervoeding kunnen optreden in de groep die het test eiwit krijgt wanneer de dieren bv het voer weigeren of het eiwit onvoldoende voedingswaarde heeft. De dieren uit de eiwitvrije groep zullen sowieso gewicht verliezen, waarbij de ervaring leert dat deze dieren wel tot de laatste dag (dag 9) levendig blijven.

Criteria die gehanteerd zullen worden zijn:

Voor de groepen die het test-eiwit krijgen:

1. Als het gewichtsverlies meer dan 20% groter is dan het gemiddelde van de dieetgroep waarin het dier zich bevindt, of een dier meer dan 20% van zijn eigen gewicht verliest ten opzichte van het gewicht bij start van het dieet.
2. Als het dier bovendien zijn levendigheid verliest (geen nieuwsgierigheid of activiteit in de kooi of bij oppakken).
3. Als het dier op twee opeenvolgende dagen niet heeft gegeten heeft.

Voor de eiwit-vrije groep gelden dezelfde criteria, met één aanpassing binnen criterium 1: als een dier meer dan 30% van zijn eigen gewicht verliest ten opzichte van het gewicht bij start van het dieet.

De beslissing om een dier uit de proef te halen zal in overleg met de biotechnicus worden genomen.

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

Op grond van onze ervaringen uit het verleden schatten we dit percentage op 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.

De duur van de belasting van de proefdieren in de eiwitvrije groep, die leidt tot gewichts-/spierverlies, is beperkt, en de dieren blijven levendig. Er zijn geen handelingen die pijn en lijden veroorzaken in de overige dieet groepen, afgezien van het verblijf in metabolisme kooien gedurende 9 dagen. In zijn geheel worden daarom de negatieve effecten geclassificeerd als:

Matig.

## **Einde experiment**

### **L. Wijze van doden**

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

Nee

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

De dieren zijn door het specifieke dieet niet geschikt om voor andere proeven gebruikt te worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

3 september 2015



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

1. Aanvraagnummer: AVD485002015207
2. Titel van het project: Kwaliteit van nieuwe eiwitten
3. Titel van de NTS: Het meten van de voedingswaarde van nieuwe eiwitten
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
De nog te erkennen DEC-Wageningen-UR; Dit is een samenvoeging van DEC-DLO en DEC-WU.  
[Redacted]  
Secretaris: [dec@wur.nl](mailto:dec@wur.nl)
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 05-08-2015  
Aanvraag compleet: ja  
In vergadering besproken: 18-08-2015  
Anderszins behandeld: nee  
Termijnonderbreking van 24-08-2015 tot 25-08-2015  
Aanpassing aanvraag: 25-08-2015  
Advies aan CCD: 03-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 24-08-2015  
Strekking van de vragen:  
De DEC heeft vragen gesteld over:
  - Het projectplan:
    - Toelichting op het vernieuwende van de te onderzoeken stoffen
    - Toelichting op de gekozen methodiek en de werking van de modellen
  - De bijlagen:
    - Enkele tekstuele opmerkingen;
    - Het toevoegen van humane eindpunten;
    - Verheldering t.a.v. het al dan niet toepassen van verdoving;
    - Enkele redactionele opmerkingen ter verheldering.
  - M.b.t. de niet-technische samenvatting:
    - M.n. redactionele opmerkingen ter verheldering/ voorkoming van misverstanden.  
Datum antwoorden: 25-08-2015  
Strekking van de antwoorden:  
De onderzoeker heeft de vragen van de DEC beantwoord en de aanvraag tot tevredenheid van de DEC dienovereenkomstig aangepast.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

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

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



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

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en wettelijk vereist is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.
3. Het reële belang van het project wordt door de DEC onderschreven. Het project richt zich op het onderzoeken van de voedingswaarde en kwaliteit van nieuwe eiwitten en nieuwe producten die door bedrijven worden ontwikkeld, mede in de context van de wereldwijd toenemende behoefte aan voedsel. Hiervoor moet een dossier worden opgebouwd dat beoordeeld wordt door de daarvoor bevoegde autoriteiten (EFSA/ FDA). De dierstudies die hiervoor worden uitgevoerd, verlopen volgens een voorgeschreven protocol.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project. Het project is haalbaar omdat het diermodel eenvoudig van opzet is en de uitkomst een rechtstreekse maat is voor de kwaliteit van een eiwit in vergelijking met een daarvoor vastgestelde standaard. Het betrokken instituut heeft veel ervaring met dieetinterventiestudies in proefdieren, met name in verschillende rattenmodellen. Het heeft beide beschreven protocollen eerder uitgevoerd. Het is bekend met de kritieke punten van deze protocollen en kan daar bij de uitvoering adequaat op inspelen indien nodig.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:  
De dieren worden individueel gehuisvest (in metabolismekooien). Daarnaast wordt de controlegroep in een type dierproef gevoerd met een eiwit-vrij dieet. Dit is afdoende beargumenteerd.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal, afhankelijk van het type dierproef bestaan uit individuele huisvesting, eiwitvrij voer (met gewichts-/spierverlies), herhaaldelijk wegen (stress).
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Vervanging door bijvoorbeeld een in-vitro-systeem is verworpen omdat de autoriteiten vragen om het meten van eiwitkwaliteit in een dierstudie. Dit heeft te maken met het feit dat er geen goed in-vitro-systeem of ex-vivo-systeem bestaat voor bestudering van eiwitkwaliteit.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De minimale groepsgrootte is voorgeschreven door het protocol. Er worden geen extra dieren gebruikt om eventuele drop-outs te vervangen. Waar mogelijk zullen testen van meerdere eiwitten worden gecombineerd, zodat er minder controlegroepen nodig zijn. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Er wordt voor gezorgd dat de dieren niet langer dan nodig individueel worden gehuisvest. Het wegen van de dieren zal door ervaren proefdierverzorgers worden gedaan om de stress tot een minimum te beperken. Om het ongerief van de individuele huisvesting te beperken wordt kooiverrijking toegepast. Ook zullen de dieren elkaar kunnen horen en ruiken. Vanwege het gewichtsverlies zal de temperatuur in de kamer iets verhoogd worden.  
De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken. Zij heeft hierbij speciale aandacht gevraagd voor het gebruik van een controlegroep met een eiwitvrij dieet.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

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

De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan het ontwikkelen van nieuwe eiwitten of nieuwe producten die voorzien in een toenemende vraag naar voeding met een goede voedingswaarde. De uitvoering is niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

Zowel in de IvD als in de DEC is de discussie gevoerd over de toelaatbaarheid van een dierproef, waarin aan een controlegroep een eiwitvrij dieet wordt gevoerd, mede gezien het feit, dat dit bij andere diersoorten in vergelijkbaar onderzoek al geen staande praktijk meer is. Zij betreurt het dat in de voorgeschreven protocollen dit nog wel verplicht is. De DEC juicht het toe, dat de onderzoeker bij de PDCAAS streeft naar een combinatie van proeven om zo te besparen op een controlegroep die geen eiwit in het voer krijgt. Daarnaast ondersteunt de DEC krachtig en nadrukkelijk het door de onderzoeker vermelde streven om de eiwitvrije groep weg te laten door gebruik te maken van de beschikbare historische data, aangezien er steeds met mannelijke dieren van dezelfde rattenstam op dezelfde leeftijd wordt gewerkt.

#### **E. Advies**

##### **1. Advies aan de CCD:**

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde:

- o De onderzoeker stelt alles in het werk, om het gebruik van een eiwitvrije groep te vermijden en overlegt dit bij elk voorgenomen experiment met de IvD.

##### **2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

NIZO food research



Postbus 20

6710 BA EDE



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD485002015207

**Bijlagen**

2

Datum 04-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD485002015207. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 48500

Naam instelling of organisatie: NIZO food research

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 09139048

Straat en huisnummer: Kernhemseweg 2

Postbus: 20

Postcode en plaats: 6710 BA Ede

IBAN: NL30RABO0307043800 (BIC: RABONL2U)

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: NIZO food research B.V.

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie: project manager/Senior Scientist

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: project manager/Senior Scientist  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 augustus 2015  
Geplande einddatum: 31 juli 2020  
Titel project: Kwaliteit van nieuwe eiwitten  
Titel niet-technische samenvatting: Het meten van de voedingswaarde van nieuwe eiwitten  
Naam DEC: Dierexperimentencommissie Wageningen Universiteit  
Postadres DEC: Afdeling Corporate Governance & Legal Services Postbus 9101 6700 HB Wageningen  
E-mailadres DEC: DEC@wur.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:   
Functie: Project manager  
Plaats: Ede  
Datum: 3 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

NIZO food research

Postbus 20

6710 BA EDE



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD485002015207

**Bijlagen**

2

Datum 04-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 4 september 2015

Vervaldatum: 4 oktober 2015

Factuurnummer: 201570207

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD485002015207 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 29 september 2015 11:03  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD485002015207; reactie op uw vragen

Geachte [REDACTED],

Hierbij stuur ik u een reactie op uw vragen bij het dossier AVD485002015207.

Met vriendelijke groet,  
[REDACTED]

1. Omdat het voor ratten, zeker op deze jonge leeftijd een hoog ongerief is om individueel gehuisvest te zijn willen wij aan de aanvrager de vraag voorleggen of deze dieren niet per paar gehuisvest kunnen worden. *Dieren worden individueel gehuisvest om de individuele voedsel inname te kunnen correleren aan de individuele groei van de dieren. Indien de ratten in paren worden gehuisvest dan wordt de statistische eenheid gereduceerd van 2 naar 1 (de rattenkooi is in dit geval 1 statistische eenheid). Het voorgeschreven aantal ratten per groep is 10. Om dezelfde "power" te bereiken zouden we dan dus 20 dieren nodig hebben per groep. Indien we ratten gaan huisvesten in paren hebben we met de huidige studieopzet dus niet genoeg dieren per groep om verschillen in PER te kunnen aantonen. De AOAC 960.48 richtlijn zegt hierover:*

#### ***D. Assay Period***

*Throughout assay period keep each rat in individual cage and provide with appropriate assay diet and H<sub>2</sub>O ad libitum. During assay period maintain all conditions of environment as uniform as possible with respect to each of groups being compared to ANRC reference casein. Record body weight of each rat on beginning day of assay period and body weight and food intake of each rat at regular intervals, not >7 days, and on 28th day after beginning of assay period.*

2. In dierproef 3.4.4.2 wordt bij de humane eindpunten beschreven dat een gewicht verlies van 20% aanleiding is om de dieren uit de proef te nemen. Echter, nergens in het protocol wordt een weegmoment beschreven. Nu duurt de totale proef 9 dagen dus de kans dat de HEP wordt bereikt is wellicht klein, maar wij willen de onderzoeker vragen na de "run in" periode van 4 dagen een weegmoment in te bouwen, of de beschrijving van de HEP aan te passen/ te verwijderen wanneer hier niet op gecontroleerd wordt. *De dieren zullen bij aanvang van de studie en daarna regelmatig (2x per week) worden gewogen.*

NIZO food research BV  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

P.O. Box 20, 6710 BA EDE, The Netherlands  
Kernhemseweg 2, 6718 ZB EDE, The Netherlands



24 Sept: Food Valley Regio Open Days, Ede  
30 Sept- 2 Oct: 9<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference, Papendal  
6-8 Oct: Droplets, Enschede  
8 Oct: Workshop: Inspiring Bites, Ede  
9 Oct: KNMvD / FVE National Congress Day, Nieuwegein  
12-13 Oct: Food Valley Expo, Wageningen

Visit our website at [www.nizo.com](http://www.nizo.com). Follow us:  

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** donderdag 24 september 2015 14:57  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** FW: aanhouden beoordelen AVD485002015207

Geachte [REDACTED],

Onderstaande vragen zijn gesteld bij de behandeling van dossier AVD485002015207. Ik heb van [REDACTED] een 'out of office' ontvangen, waarin uw naam als vervanging wordt opgegeven. Wellicht heeft u deze vraag al ontvangen maar is het mogelijk voor de voortgang van de behandeling dat u een toelichting op deze vragen geeft in overleg met [REDACTED]?

Vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 21 september 2015 12:19  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanhouden beoordelen AVD485002015207

Geachte [REDACTED],

Op 4 september hebben wij uw projectaanvraag "kwaliteit van nieuwe eiwitten" ontvangen. Bij de behandeling van deze aanvraag hebben wij nog de volgende twee vragen voor u:

In de bijlage dierproeven 3.4.4.1: Protein Efficiency ratio, wordt beschreven dat de dieren, ratten van 3-4 weken oud, gedurende 28 dagen individueel gehuisvest worden. Dit om de uiteindelijke PER waarde te berekenen van een nieuwe eiwitbron. Deze berekening is voornamelijk gebaseerd op voerinnamen (eiwitnamen) vs groei. Volgens voorschrift AOAC 960.48

In deze richtlijn staat dat de PER wordt berekend door :  $\frac{\text{the total weight gain of the test group (g)}}{\text{total protein consumed (g)}}$

In punt 6 van dit protocol staat: calculate the PER using the average total weight gain and average total protein intake for each diet group at day 28.

Omdat het voor ratten, zeker op deze jonge leeftijd een hoog ongerief is om individueel gehuisvest te zijn willen wij aan de aanvrager de vraag voorleggen of deze dieren niet per paar gehuisvest kunnen worden. Zoals uit bovenstaande citaten uit de richtlijn blijkt gaat het om robuust berekende gemiddelde getallen waaruit de PER berekend wordt. Gezien de huisvesting die de aanvrager beschrijft, namelijk huisvesting op bedding en het 1-2 maal per week wegen van de dieren zal er uit die getallen een aanzienlijke ruis komen, zoals bijvoorbeeld

verspilling van voer, tijdstip van wegen op de dag, die het niet rechtvaardigt dat de dieren omwille van nauwkeurigheid gedurende 28 dagen individueel gehuisvest moeten worden.

Als de dieren in paren worden gehuisvest en de voedselinname door 2 wordt gedeeld zou dit eenzelfde robuuste nauwkeurigheid opleveren. Hierbij zou ook nog de veronderstelling kunnen worden gedaan dat dieren die individueel gehuisvest zijn een ander eetpatroon hebben/ meer voer verspillen door stress en verveling.

In dierproef 3.4.4.2 wordt bij de humane eindpunten beschreven dat een gewicht verlies van 20% aanleiding is om de dieren uit de proef te nemen. Echter, nergens in het protocol wordt een weegmoment beschreven. Nu duurt de totale proef 9 dagen dus de kans dat de HEP wordt bereikt is wellicht klein, maar wij willen de onderzoeker vragen na de "run in" periode van 4 dagen een weegmoment in te bouwen, of de beschrijving van de HEP aan te passen/ te verwijderen wanneer hier niet op gecontroleerd wordt.

Conform afspraken zijn deze vragen eerst aan de DEC WUR voorgelegd om te vragen of zij deze aspecten hebben betrokken in hun advies. De DEC heeft dit niet betrokken in het uitgebrachte advies. De behandeltermijn van uw aanvraag wordt opgeschort tot wij van u een antwoord hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet, XXXXXXXXXX

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 14 oktober 2015 12:13  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: AVD485002015207; besluit CCD  
**Bijlagen:** AVD485002015207 NIZO - Kwaliteit nieuwe eiwitten - NTS 151014 v2.docx;  
AVD485002015207 NIZO - Kwaliteit nieuwe eiwitten - bijlage 2 beschrijving  
dierproeven 151014 v2 final.docx

Geachte [REDACTED],

Hierbij stuur ik u de aangepaste NTS en bijlage 3.4.4.2 toe:

- in de NTS is het ongerief nu weergegeven als 50% matig (voor PER, bijlage 1) en 50% ernstig (voor PDCAAS, bijlage 2)
- in bijlage 2 zijn de volgende aanpassingen gedaan:
  - o wegen van de dieren is ingevoegd (paragraaf A, D, I)
  - o ongerief is aangepast naar ernstig (paragraaf K)

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd, en zie de beschikking en vergunning graag tegemoet.

Hartelijke groet,

[REDACTED]

NIZO food research BV

[REDACTED]  
[REDACTED]

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

P.O. Box 20, 6710 BA EDE, The Netherlands  
Kernhemseweg 2, 6718 ZB EDE, The Netherlands



24 Sept: Food Valley Regio Open Days, Ede  
30 Sept- 2 Oct: 9<sup>th</sup> NIZO Dairy Conference, Papendal  
6-8 Oct: Droplets, Enschede  
8 Oct: Workshop: Inspiring Bites, Ede  
9 Oct: KNMvD / FVE National Congress Day, Nieuwegein  
12-13 Oct: Food Valley Expo, Wageningen

Visit our website at [www.nizo.com](http://www.nizo.com). Follow us:  

---

**From:** [REDACTED]  
**Sent:** woensdag 14 oktober 2015 10:08  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** FW: AVD485002015207; besluit CCD

Zoals net telefonisch besproken stuur ik onderstaande mail nogmaals door. We hebben afgesproken dat u de herziene NTS stuurt, en de aanpassing van het invoegen van weegmomenten om de Humane Eindpunten te borgen.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** maandag 12 oktober 2015 10:04  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: AVD485002015207; besluit CCD

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag AVD485002015207, Kwaliteit van nieuwe eiwitten, behandeld in de vergadering. De CCD heeft besloten uw aanvraag te vergunnen. Hierbij is opgemerkt dat de ongerief classificering van bijlage dierproeven 3.4.4.2 niet correct is. Conform bijlage VIII van de Richtlijn 2010/63/EU is het verblijf in metabole kooien langer dan 5 dagen ernstig ongerief. De CCD verzoekt u om dit aan te passen in de Niet Technische Samenvatting en een herziene NTS aan ons te sturen. Zodra wij de herziene NTS hebben ontvangen sturen wij u de beschikking en vergunning toe, pas dan kunt u met uw project beginnen.

Vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

|     |   |                    |   |
|-----|---|--------------------|---|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 48500              |   |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                              | NIZO food research |   |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                                  | Volgnummer         | Type dierproef  |
|     | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 2                  | Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimentele strategie voor een PDCAAS studie is vastgelegd in de Official Methods van de AOAC, protocol nummer 991.29. Jonge ratten verblijven gedurende 9 dagen in een metabole kooi. Ze krijgen een dieet met het eiwit waarvan de kwaliteit bepaald moet worden. Het dieet is beperkt tot 15 gram per dag. Gedurende de eerste dagen is dit meer dan de ad libitum opname, aan het einde van de 9 dagen is dit ca. 95% van de ad libitum opname. Overblijvend voer wordt gewogen en feces worden verzameld. Eventueel kan ook urine verzameld worden. Stikstof in de feces (en evt urine) wordt gemeten als maat voor de hoeveelheid eiwit die niet wordt opgenomen. Als controle wordt een groep meegenomen die een eiwitvrij dieet krijgt. De feces van deze groep geven de waarde voor het endogene stikstofverlies. Soms wordt een controlegroep meegenomen die caseïne krijgt als referentie eiwit.

Primaire uitkomsten zijn:

True digestibility (TD%): afbreekbaarheid van eiwit gecorrigeerd voor endogene stikstof.

Apparent digestibility (AD%): afbreekbaarheid van eiwit niet gecorrigeerd voor endogene stikstof → dit geeft een onderschatting van de afbreekbaarheid.

Net Protein Utilization (NPU) en Biological value (BV): wanneer ook stikstof in de urine wordt gemeten, kan de NPU en BV berekend worden: NPU is het percentage ingenomen stikstof dat in het lichaam is opgenomen, en de BV geeft het percentage van het geabsorbeerde stikstof dat in het lichaam is opgenomen. De BV wordt berekend als  $NPU \times TD\%$ .

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 experimentele strategie voor een PDCAAS studie is vastgelegd in de Official Methods van de AOAC, protocol nummer 991.29:

Per dieetgroep zijn 8 dieren nodig. De dieren moeten bij binnenkomst 50-70 g wegen (ongeveer 3 weken oud), en moeten na binnenkomst 2-7 dagen op een regulier dieet (gemalen chow) in groepen gehuisvest om te acclimatiseren. Een acclimatisatieperiode van 7 dagen wordt nagestreefd.

Daarna worden de dieren gedurende 9 dagen individueel gehuisvest in metabolisme kooien (dag 1-4 als run-in periode voor het dieet, dag 5-9 als meet-dagen). Huisvesting in metabolisme kooien is van belang omdat per dier de voer/eiwit inname gemeten moet worden, en de feces (en urine) van elk dier verzameld moet worden van dag 5-9. De eiwitinname moet gerelateerd worden aan de stikstof in feces (en urine) van hetzelfde dier. Water is ad libitum beschikbaar voor de dieren. Voer is beperkt tot 15 gram per dag. De hoeveelheid voerinnname wordt bepaald door de hoeveelheid overblijvend voer te wegen. De dieren worden gewogen voor en 2-3 maal tijdens de 9 dagen van de studie.

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

Het volgens de Official Methods van de AOAC voorgeschreven aantal dieren per groep is 8. Dit protocol is internationaal vastgesteld, en is gebaseerd op studies uit het verleden waarin naar eiwitkwaliteit gekeken is met deze opzet. Vanwege de regelgeving wordt dit aantal als minimaal benodigd aantal gehanteerd binnen dit project. Omdat er geen grote belastende of levensbedreigende handelingen worden verricht, hoeven er geen extra dieren in de studie opgenomen te worden om te corrigeren voor uitval.

## **B. De dieren**

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

Mannelijke gespeende ratten worden gebruikt.

Dieren van hetzelfde geslacht zijn nodig om de spreiding minimaal te houden. De internationale richtlijnen schrijven voor dat met mannelijke ratten gewerkt dient te worden.

De soort die hiervoor door NIZO wordt gebruikt is Wistar Unilever. Dit is een veel gebruikte rattensoort die geschikt is voor dieet studies.

De dieren moeten jong zijn omdat ze dan nog volop groeien, en het eiwit in de voeding daarom volop benut wordt. Daardoor wordt een redelijke inschatting verkregen van de verteerbaarheid en opname van het eiwit.

Per dieetgroep zijn 8 dieren nodig. Bij een gemiddelde proef zullen 2 eiwitten getest worden, en worden 2 controlegroepen gebruikt (een referentie eiwit en een eiwit-vrije groep). Er zijn dus 4 groepen nodig, dus in totaal 32 dieren. We verwachten maximaal 1 klantvraag per 1-2 jaar. Over een periode van 5 jaar betekent dit een schatting van maximaal 128 proefdieren.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

Vervanging door bijvoorbeeld een in vitro systeem is verworpen omdat de autoriteiten vragen om het meten van eiwit kwaliteit in een dierstudie. Dit heeft te maken met het feit dat er geen goed in vitro systeem of ex vivo systeem bestaat voor bestudering van eiwitkwaliteit.

Vermindering van het aantal proefdieren: door het toepassen van de volgens de richtlijnen vereiste minimale groepsgrootte (minimaal 8 dieren per dieetgroep). Er wordt voor gekozen geen extra dieren te includeren om eventuele drop-outs te vervangen.

Voor het accuraat meten van de voerinname en voor het individueel verzamelen van feces (en urine) is, zoals in het AOAC protocol voorgeschreven, individuele huisvesting noodzakelijk in metabolisme kooien. **Wel wordt er voor zorg gedragen dat de dieren niet langer dan nodig individueel worden gehuisvest** (alleen tijdens de 9 dagen waarop het dieet wordt gegeven). Vanwege het inzetten van een groep die een eiwitvrij dieet krijgt, en daardoor extra ongerief ervaart, streeft NIZO ernaar om, wanneer dit mogelijk is, meerdere eiwitten tegelijk binnen één proef te analyseren. Dan zijn de controle groepen slechts eenmaal nodig, om de PDCAAS waarde van meerdere eiwitten tegelijk te bepalen. Dit vermindert het aantal benodigde dieren, en vermindert ook het ongerief. Vanwege de vereiste proefopzet is dit de maximaal haalbare verfijning.

Historische data zijn niet beschikbaar voor de eiwitvrije groep. Deze gegevens worden niet in publicaties vermeld. NIZO zal, waar dat mogelijk is, aan de opdrachtgever vragen om bij de autoriteiten die de proef vereisen het verzoek neer te leggen of NIZO gebruik mag maken van de eigen historische data. Wanneer de autoriteiten daarmee akkoord gaan, kan de eiwitvrije groep uit de proef worden weggelaten.

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 proefdieren die gedurende 9 dagen een eiwitvrij dieet krijgen, ervaren wel ongerief, omdat er gewicht-/spierverlies optreedt. Het is echter gebleken dat de dieren ondanks dit gewichts-/spierverlies wel levendig blijven. Tijdens de proef zal dit samen met de dierdeskundige gevolgd worden.

NIZO zal in contact met de opdrachtgever bespreken of bij de beoordelende autoriteiten verzocht kan worden om de eiwitvrije groep weg te laten en gebruik te maken van de historische data die NIZO heeft.

Het individueel huisvesten in metabolismekooien is voor de jonge proefdieren ongerieflijk. Om hieraan tegemoet te komen wordt kooiverrijking toegepast die het verzamelen van urine en feces niet verhindert en die geen lawaai veroorzaakt waardoor de dieren gestrest zouden kunnen raken.

Het wegen van de dieren geeft enige vorm van stress. Dit wordt door ervaren proefdiervverzorgers gedaan om de stress tot een minimum te beperken.

Van de proefopzet zijn geen specifieke milieueffecten te verwachten. Afvalverwerking van de kooi inhoud en kadavers wordt volgens richtlijnen bij de proefdierfaciliteiten uitgevoerd om eventuele milieueffecten 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.

Wanneer een klant met een verzoek voor een PDCAAS studie naar NIZO komt wordt besproken om welk eiwit of product het gaat, en wat de reden is waarom de klant een PDCAAS studie wil laten uitvoeren. Er wordt bovendien nagegaan of er eerdere (vergelijkbare) studies zijn



uitgevoerd. Omdat het vrijwel altijd gaat om nieuwe eiwitten en producten waarin eiwitten verwerkt zijn, is de kans op duplicering minimaal.

Hierbij zal in de beschikbare literatuur en op internet gecheckt worden of een dergelijke studie eerder is gepubliceerd (Pubmed, Google). Omdat er echter geen verplichting is om gegevens uit dergelijke studies publiek openbaar te maken, betekent het dat deze check beperkt wordt door datgene wat publiek vindbaar is.

De vraag om een PDCAAS studie te laten doen is meestal gedreven door eisen vanuit de autoriteiten. Wanneer er (nog) geen wettelijke eis aan ten grondslag ligt, zal NIZO in principe niet tweemaal dezelfde proef doen wanneer het eiwit dat getest moet worden identiek is. Het is echter bekend dat eiwitten die op verschillende manieren gezuiverd of opgewerkt worden wel een verschillende kwaliteit kunnen hebben. Dus wanneer een klant een eiwitsoort wil laten testen dat al eerder in een dergelijke proef getest is, zal NIZO controleren of de bron, zuivering of opwerking van het eiwit reden geeft om deze proef uit te voeren. In overleg met de klant zal dan besproken worden of een proef noodzakelijk is of niet.

## 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 in metabolismekooien, terwijl groepshuisvesting in reguliere kooien de dieren meer gerief geeft. Dit is echter noodzakelijk om de feces (en urine) individueel te kunnen verzamelen, en de stikstof in deze samples aan de individuele voedsel inname te kunnen correleren.

Om hieraan tegemoet te komen wordt kooiverrijking toegepast die geen lawaai veroorzaakt waardoor de dieren gestrest zouden kunnen raken.

De controlegroep die een eiwit-vrij dieet krijgt wordt niet conform de normen gevoerd. Van de norm wordt afgeweken omdat een endogene metabole waarde verkregen moet worden voor het berekenen van de werkelijke verteerbaarheid van een eiwit (True Digestibility).

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In de controlegroep die een eiwitvrij dieet krijgt, zal gewichts-/spierverlies optreden. Of daarnaast ook organen worden aangetast is aan de buitenkant niet zichtbaar, en is in de literatuur niet gerapporteerd. Gedurende de negen dagen van de studie blijven de dieren levendig, wat suggereert dat er geen grote afwijkingen in de normale fysiologie en metabolisme optreden.

Verder is de huisvesting in metabolismekooien en regelmatig wegen een aantasting van het welzijn.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De oorzaak van gewichts-/spierverlies is dat er geen eiwit in de voeding van de controlegroep zit (dosering koolhydraten, vet, vezels, vitaminen en mineralen voldoen aan richtlijnen), waardoor onvoldoende bouwstoffen beschikbaar zijn voor het in stand houden en opbouwen van de spieren.

Verblijf in metabolismekooien is een aantasting van welzijn omdat de dieren individueel gehuisvest worden op een roosterbodem.

Regelmatig wegen geeft enige vorm van stress.

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

De studie heeft voor een voedingsproef een relatief korte duur (9 dagen), waardoor de periode van het ongerief beperkt blijft. Vanwege het gewichtsverlies zal de temperatuur in de kamer iets verhoogd worden. Ook zullen de dieren dagelijks gecontroleerd worden op levendigheid. Wanneer de dieren hun levendigheid verliezen zal met de dierdeskundige overlegd worden of de proef moet worden afgebroken. Het gevolg hiervan is dat de hele proef niet meer geïnterpreteerd kan worden, waardoor de belasting voor alle dieren nutteloos is geweest. Dit belang zal meegenomen worden in de afweging voor het wel of niet afbreken van de proef. In de meest recente studie bleken de dieren voldoende levendig te blijven om te besluiten de proef niet voortijdig te beëindigen.

De dieren verblijven in dezelfde ruimte en kunnen elkaar dus wel horen en ruiken. Bovendien wordt kooiverrijking toegepast.

### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Er kunnen mogelijk darmproblemen ontstaan vanwege eventuele antinutritionele factoren uit de eiwitbron. Ook zou er ondervoeding kunnen optreden in de groep die het test eiwit krijgt wanneer de dieren bv het voer weigeren of het eiwit onvoldoende voedingswaarde heeft. De dieren uit de eiwitvrije groep zullen sowieso gewicht verliezen, waarbij de ervaring leert dat deze dieren wel tot de laatste dag (dag 9) levendig blijven.

Criteria die gehanteerd zullen worden zijn:  
Voor de groepen die het test-eiwit krijgen:

1. Als het gewichtsverlies meer dan 20% groter is dan het gemiddelde van de dieetgroep waarin het dier zich bevindt, of een dier meer dan 20% van zijn eigen gewicht verliest ten opzichte van het gewicht bij start van het dieet.
2. Als het dier bovendien zijn levendigheid verliest (geen nieuwsgierigheid of activiteit in de kooi of bij oppakken).
3. Als het dier op twee opeenvolgende dagen niet heeft gegeten heeft.

Voor de eiwit-vrije groep gelden dezelfde criteria, met één aanpassing binnen criterium 1: als een dier meer dan 30% van zijn eigen gewicht verliest ten opzichte van het gewicht bij start van het dieet.

De beslissing om een dier uit de proef te halen zal in overleg met de biotechnicus worden genomen.

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

Op grond van onze ervaringen uit het verleden schatten we dit percentage op 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.

De duur van de belasting van de proefdieren in de eiwitvrije groep, die leidt tot gewichts-/spierverlies, is beperkt, en de dieren blijven levendig. Er zijn geen handelingen die pijn en lijden veroorzaken in de overige dieet groepen, afgezien van het verblijf in metabolisme kooien gedurende 9 dagen. In zijn geheel worden daarom de negatieve effecten geclassificeerd als:

Ernstig.

## **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 dieren zijn door het specifieke dieet niet geschikt om voor andere proeven gebruikt te worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Centrale Commissie Dierproeven



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

NIZO food research

Postbus 20  
6710 BA EDE

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD485002015207

**Uw referentie**

Datum **15 OKT. 2015**  
Betreft **Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven**

**Bijlagen**  
1

Geachte heer/mevrouw

Op 3 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Kwaliteit van nieuwe eiwitten" met aanvraagnummer AVD485002015207. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 22 september 2015 heeft u via de mail vragen van de CCD beantwoord. Op basis van uw antwoord heeft u bijlage dierproeven 3.4.4.2 aangepast. De NTS is aangepast omdat het ongerief niet correct was geclassificeerd. De aangepaste documenten hebben wij op 14 oktober ontvangen.

### **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 eerste voorwaarde is gesteld door de DEC. De CCD volgt deze voorwaarde omdat deze bijdraagt aan verbetering van het dierenwelzijn.

De tweede voorwaarde is een algemene voorwaarde die wordt gesteld bij vergunningen met een looptijd van 5 jaar. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit artikel 10 lid 1a van de wet. U kunt met uw project "Kwaliteit van nieuwe eiwitten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 oktober 2015 tot en met 31 juli 2020. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Wageningen Universiteit gevoegd. Dit advies is opgesteld op 3 september 2015. 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. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Daarnaast stelt de commissie een algemene voorwaarde.

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

### **Beoordeling achteraf**

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

**Bezwaar**

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

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

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

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

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

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen  
- Vergunning

**Datum**  
14 oktober 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD485002015207

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: NIZO food research  
Adres: Postbus 20  
Postcode en woonplaats: 6710 BA Ede  
Deelnemersnummer: 48500

deze projectvergunning voor het tijdvak 15 oktober 2015 tot en met 31 juli 2020, voor het project "Kwaliteit van nieuwe eiwitten" met aanvraagnummer AVD485002015207, volgens advies van Dierexperimentencommissie Wageningen Universiteit.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is project manager/Senior Scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 3 september 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 3 september 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per mail op 14 oktober 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 3 september 2015;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 oktober 2015.

### Dierproeven

| Naam dierproef  | Diersoort   | Aantal dieren | Ernst              |
|---|---|---------------|--------------------|
| Protein Efficiency Ratio (PER)                            | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Wistar unilever | 120           | Matig / moderate   |
| Protein digestibility Corrected Amino Acid Score (PDCAAS) | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Wistar unilever | 128           | Ernstig/<br>severe |

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd door de aanvrager in samenwerking met de IvD. Deze beoordeling zal uiterlijk augustus 2020 plaatsvinden.

### Voorwaarden

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

De onderzoeker stelt alles in het werk, om het gebruik van een eiwitvrije groep te vermijden en overlegt dit bij elk voorgenomen experiment met de IvD.

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

**Datum**  
14 oktober 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD485002015207

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



## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond. Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

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

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade

**Datum**  
14 oktober 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD485002015207

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

| Inventaris Wob-verzoek W16-04s |                                    |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                                    | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                           | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS 20151208</b>                |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier                  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                              | Brief mbt factuurinformatie        |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 3                              | Projectvoorstel oud                |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 4                              | Niet-technische samenvatting oud   |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 5                              | Bijlagen dierproeven oud           |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 6                              | DEC-advies                         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                              | Ontvangstbevestiging               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 8                              | Brief CCD 17-08-2015               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | Brief reactie 19-08-2015           |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                             | Projectvoorstel nieuw              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 11                             | Niet-technische samenvatting nieuw | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 12                             | Bijlagen dierproeven nieuw         |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 13                             | Advies CCD                         |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 14                             | Beschikking en vergunning          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |

14 AUG 2015



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*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 | [REDACTED]                                 |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| KVK-nummer  | 4  | 1 | 0 | 5 | 5 | 6 | 2 | 9 |  |  |
| Straat en huisnummer<br>Postbus                     | Geert Grootplein-Noord<br>9101             |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| 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] |  |  |  |  |  |  |  |  |  | <input type="checkbox"/> Dhr.            | <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| Afdeling                    | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| Telefoonnummer              | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| E-mailadres                 | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. | <input type="checkbox"/> Mw.            |
| Functie                     | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| Afdeling                    | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| Telefoonnummer              | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |
| E-mailadres                 | [REDACTED] |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |   |

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

- 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.
- Instantievoor Dierenwelzijn
- 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 08 . 09 . 20 15
- Einddatum 08 . 09 . 20 19
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Elucidating the link between environmental factors and mitochondrial dysfunction leading
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Effecten van de darmmicrobiota op ontwikkelingsstoornissen
- 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 |
| E-mailadres |                                |

## 4 Betaalgegevens

4.1 Om welke type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00

Lege

Wijziging € Lege

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

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

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

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

DEC advies, document factuurgegevens

## 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

- 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]

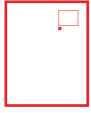
Functie Instantie voor dierenwelzijn

Plaats Nijmegen

Datum 08 - 08 - 2015

Handtekening

[REDACTED]



**Radboud universitair medisch centrum**  
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Geert Grooteplein 10  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen  
Huispost 628  
Geert Grooteplein 10

■■■■■  
■■■■■  
[www.radboudumc.nl](http://www.radboudumc.nl)

KvK 41055629/4

Datum 8 augustus 2015  
Instantie voor Dierenwelzijn

Onderwerp  
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag. Wij verzoeken u de factuur te versturen naar de IVD als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres gebruiken (■■■■■).

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij u tevens **op de factuur** de volgende gegevens te vermelden:

**Factuuradres:** Radboudumc  
28 F&A creditreuren  
Postbus 9101  
6500HB, Nijmegen  
**Kostenplaats en kostensoort:** 040823-461220  
**CDL projectnummer:** 2015-0077  
**Verantwoordelijk onderzoeker:** ■■■■■

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten

■■■■■  
Instantie voor Dierenwelzijn

■■■■■



### Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal 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](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

## 1 General information

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300  |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Elucidating the link between gut dysbiosis and mitochondrial dysfunction leading to neurodevelopmental disorders |

## 2 Categories

- |     |   |   |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research   |
|     |   | <input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research   |
|     |   | <input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production   |
|     |   | <input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier |
|     |   | <input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures                                 |
|     |   | <input type="checkbox"/> 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.

Neurodevelopmental disorders are disabilities associated mainly with the functioning of the neurological system and brain. Individuals with these disorders can experience difficulties with language and speech, behaviour, learning, motor skills, and other neurological functions. Most neurodevelopmental disorders are caused by genetic abnormalities, including fragile-X syndrome and Down syndrome. Other neurodevelopmental disorders are referred to as complex because they have multiple and complex contributors rather than one clear cause. These complex disorders typically involve cognitive, behavioural or personality characteristics (Tager-Flusberg, 1999a). Complex neurodevelopmental disorders, such as attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD), are common and affect both children and adults. Development of the nervous system is a complex process involving differentiation of neurons from neural stem cells. These differentiating neurons require high levels of energy, generated by mitochondria in the form of adenosine triphosphate (ATP). Mitochondria are localised in synapses, and synaptic function can be disturbed by mitochondrial morphology, function, and alterations in amount of mitochondria per cell (Kageyama and Wong-Riley 1982). Mitochondrial dysfunction contributes to several neurodevelopmental diseases (Anitha, Nakamura et al. 2013). Prevalence of several co-morbid features, like learning disabilities, motor delay, developmental regression, seizures and gastrointestinal (GI) dysfunctions, is typically higher in people with both a neurodevelopmental disorder and mitochondrial dysfunction (Rossignol and Frye 2012; Hsiao, McBride et al. 2013). Induced mitochondrial dysfunction in rats led to certain behavioural, metabolic and brain changes consistent with several neurodevelopmental disorders. These changes include repetitive behaviours, hyperactivity, increased amounts of reactive oxidative stress (ROS), reduced levels of antioxidants, and microglial activation (Rodríguez-capote et al. 2008).

GI dysfunction, such as chronic diarrhoea, constipation or intestinal infection, is a co-morbidity of special interest given its high prevalence and high correlation with symptom severity in several neurodevelopmental disorders (Adams, Johansen et al. 2011). The mechanisms leading to these GI problems remain unclear. One of the explanations of these GI dysfunctions found in people with neurodevelopmental disorders is dysbiosis, a significant change in gut bacterial composition. Gut bacteria contribute to neurodevelopment and function (Cryan and Dinan 2012) and there is a growing number of studies reporting dysbiosis in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders (Finegold, Downes et al. 2012; Gondalia, Palombo et al. 2012; Williams, Hornig et al. 2012; Kang, Park et al. 2013; Borre, O'Keeffe et al. 2014).

The adult human (and mouse) gut microbiota is dominated by the bacterial phyla Firmicutes and Bacteroidetes and seems to be stable and resilient against short-term changes (Faith, Guruge et al. 2013). The infant gut microbiota on the other hand is less stable and stabilises when the infant is 2-3 years old. The infant gut microbiota can be influenced by multiple factors, including antibiotics administered to the infant or mother, level of breastfeeding, mode of delivery, and genetics (Fallani, Amarri et al. 2011). Bergström et al. studied the gut microbiota of infants in a three-year Danish study with a cohort of 330 infants. Infants between 9 and 18 months old showed a significant shift in gut microbiota with the change from breastfeeding to solid foods (Bergstrom, Skov et al. 2014). Once established, the gut microbiota can be altered by antibiotic treatment, lifestyle, long-term change in diet, and bacterial infections (De La Cochetiere, Durand et al. 2005; Dethlefsen, Huse et al. 2008; Marques, Wall et al. 2015). We hypothesise a link between gut microbiota and neurodevelopmental disorders via mitochondria affecting behaviour and cognition. Bacteria can affect mitochondria in several ways, for example through short-chain fatty acids (SCFAs). SCFAs are also known to affect mitochondrial function (Belzacq, Haouzi et al. 2002, Hecker, Sommer et al. 2015), for example by inducing apoptosis in colonic epithelium cells. Some bacteria are able to modulate mitochondrial function in order to maintain their living environment by preventing host cell apoptosis or to promote bacterial spread by inducing apoptosis (Matarrese, Falzano et al. 2007; Stavru, Bouillaud et al. 2011). Distressed mitochondria generate signalling molecules such as mitokines. These mitokines exit the host cell and can bind to and regulate receptors present on all eukaryotic cells. Other bacterial species, for example *Pseudomonas* spp. are capable of disrupting mitochondrial surveillance in *Caenorhabditis elegans*. Mitochondria are responsible for the synthesis of haeme and iron-sulphur clusters. Mitochondria are an attractive target for bacteria because iron is essential for bacterial processes like DNA replication and metabolism. Therefore, bacteria developed several strategies, for example production of siderophores, to acquire iron from mitochondria. Disabling the mitochondrial surveillance pathway renders other virulence factors, anti-mitochondrial toxins or siderophores more effective (Liu, Samuel et al. 2014). *Pseudomonas* spp. are psychrotrophic bacteria, which thrive at low temperatures (0-4 degrees Celsius). These psychrotrophic bacteria are commonly found in dairy products. We hypothesise that people ingest these bacteria more often as people tend to keep dairy products in the refrigerator more often and for longer periods of time. Finally, bacteria can affect host health and neurodevelopment through short-chain fatty acids. These SCFAs (butyrate, acetate and propionate), produced mainly by gut bacteria, are absorbed by the intestinal epithelium. SCFAs are processed by the citric acid cycle in mitochondria and used in several processes. Butyrate is used by colonocytes as source of energy. Acetate and propionate are transported via the bloodstream to other tissues and organs. Acetate is used for the synthesis of long-chain fatty acids (Christ, 1968). Propionate can be used as substrate for gluconeogenesis, a process starting in the mitochondria. Oral administration of prionate to rats led to cognitive deficits, decreased social interactions, repetitive behaviour and abnormal motor activity (Shultz *et al.*, 2008). Thus, SCFAs are processed by mitochondria and fulfill several functions in the host. Dysbiosis can lead to altered levels of short-chain fatty acids (SCFA). A major cause of gut dysbiosis is treatment with antimicrobials. Various antibiotics are potential risk factors for neurodevelopmental disorders (Atladóttir, Henriksen et al. 2012; Desbonnet, Clarke et al. 2015; Rosenfeld 2015). In addition, several antibiotic classes administered, like fluoroquinolones or aminoglycosides, are associated with mitochondrial dysfunction as a result of the close similarities between mitochondria and the targeted bacteria. This is seen as a mild side-effect and is well tolerated by most treated individuals. However, this side-effect combined with the effect of antimicrobials on the gut microbiota could possibly influence neurodevelopment, and thereby cognition and behaviour in adult life. Another major cause of dysbiosis is diet, a key factor in determining gut microbial composition. Certain diets are able to impact cognition and behaviour to a great extent. Dietary therapies have been attempted to treat or ameliorate symptoms of a wide variety of neurological disorders, such as autism, epilepsy and Parkinson disease. In addition, dietary supplementation, for example omega-3 fatty acid or vitamin supplementation, is reported to have positive effects on symptoms of ADHD (Bos, Oranje et al. 2015; Rucklidge, Frampton et al. 2014). Obesity during pregnancy is

associated with mitochondrial dysfunction in the offspring (Wu, Russell et al. 2015) potentially leading to neurodevelopmental disorders. Childhood obesity is associated with poorer academic achievements and greater decay of brain structure and function. Obesity is also associated with reduced gut microbial diversity (Ley, Backh ed et al. 2005). Turnbaugh et al. demonstrate that these changes in diversity affect the metabolic potential of the microbiota. They show that the microbiota from obese individuals is more efficient in harvesting energy from diet compared to the microbiota from lean individuals. This efficiency in calorie harvest is transmissible from humans to mice by colonising germ-free mice with human microbiota from obese or lean individuals, indicating that dysbiosis contributes to obesity (Turnbaugh, Ley et al 2006). There is a growing body of research reporting significant effects of mitochondrial dysfunction on brain development and function. Studies reporting associations between dysbiosis and neurodevelopment are also numerous. However, most of these studies are correlational studies, studying the correlation rather than the causality. Dysbiosis affecting mitochondrial function potentially leading to neurodevelopmental disorders has not been studied to our knowledge.

### 3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to investigate the link between dysbiosis, mitochondrial dysfunction and developmental disorders. In order to study this link we have designed a research plan composed of multiple components. The first component of this project aims to investigate the contribution of gut microbiota or specific bacteria to behaviour and cognition. The second component of this project focusses on the link between gut dysbiosis and neurodevelopmental disorders. To study this we plan to study the effects of gut dysbiosis on mitochondrial function. With the third component of this project we intend to study effects of dietary or antimicrobial treatments on gut dysbiosis, cognition and behaviour. Finally, we plan to design antimicrobial or dietary interventions to normalise gut microbial composition resulting in healthy mitochondrial function and neurodevelopment.

Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with less distress to the mice. The central theme of our research group encompasses effects of diets on neuronal systems, emphasising cognitive disorders in relation with metabolism and cerebral circulation. Important tools available include neuroimaging, including MRS and DTI, histopathology, and behavioural test equipment.

The main objective should be achievable and realistic within the duration of the project because of the availability of knowledge, expertise and accommodation.

Important publications of our research group:

█ [REDACTED] (2013)



---

### 3.3 Relevance

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

---

The prevalence of many complex neurodevelopmental disorders, like ADHD and autism spectrum disorder (ASD), has been increasing across recent decades. These disorders have a huge impact on the affected individual, family members and society. Co-occurring disorders are common, such as dyslexia, obsessive compulsive disorder, depression and eating disorders. Studies have reported ADHD symptoms in 30-50% of individuals diagnosed with ASD. Similarly, around 66% of persons with ADHD show features of ASD (Davis & Kollins, 2012). Progress in understanding these disorders has been slow and treatment options are limited. In this study we will investigate the link between dysbiosis and neurodevelopmental disorders.

We will study effects of certain diets and antibiotics, which are capable of causing gut dysbiosis, on brain development and function. Investigating interventions changing gut microbial compositions and thereby influencing behaviour and cognition will increase knowledge about developmental disorders and could potentially result in new therapeutic interventions to treat or ameliorate symptoms of neurodevelopmental disorders. In addition, we aim to elucidate the link between gut dysbiosis and neurodevelopmental disorders by studying the role of mitochondrial dysfunction in these disorders.

---

### 3.4 Research Strategy

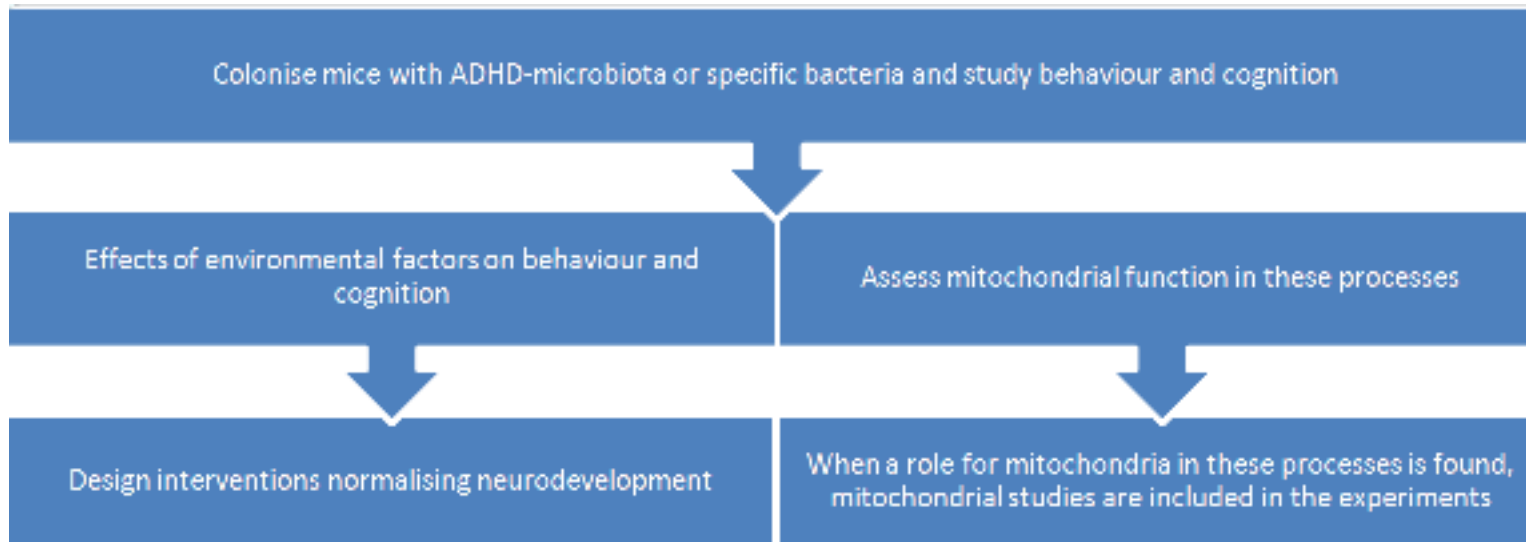
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

---

Our main objective is to investigate the link between gut microbiota and neurodevelopment. In order to study this link we have designed several randomised experiments.

1. We aim to investigate the effects of dysbiosis on cognition and behaviour. We will do this by colonising mice with human microbiota from individuals with ADHD or by colonising mice with specific bacteria. After this we will study the impact of gut microbiota on behaviour and cognition.
2. We plan to study the link between gut dysbiosis, behaviour and function. Therefore, we will examine mitochondrial (dys)function after inducing dysbiosis.
3. We aim to study environmental factors that can lead to dysbiosis and study effects of dysbiosis on neurodevelopment.
4. We intend to design dietary and antimicrobial interventions to restore the gut microbiota to a healthy state, and thereby normalise neurodevelopment.

Overview of this project:



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. Gut microbiota from people with ADHD is different in composition compared to gut microbiota from persons without ADHD (personal communication and Pärtty et al., 2015). First, we plan to study effects of the microbiota on cognition and behavior. Most gut bacteria cannot be cultured which makes studying their causal role in disorders technically challenging. To investigate whether gut dysbiosis is a cause or consequence of neurodevelopmental disorders, we will colonise germ-free mice with human microbiota from individuals with ADHD. Any dysbiosis present in the donor microbiota will be transferred to the recipient. Germ-free mice exhibit characteristics reminiscent of several neurodevelopmental disorders, like abnormal stress response and increased motor activity. This altered behaviour can be reversed by introduction gut microbiota. (Diaz Heijtz et al., 2011; Sudo et al., 2004). Thus, using conventionally raised mice, mice with normal gut microbiota, has the advantage that these mice don't show abnormal behavioural patterns and brain function. However, these mice already possess gut microbiota. When we introduce human gut microbiota in these mice, the 'new bacteria' will compete with the 'old bacteria'. Therefore, we prefer to use germ-free mice to study effects of gut microbiota op neurodevelopment. To study effects of the microbiota on neurodevelopment, we will investigate behaviour and cognition. ADHD in humans is associated with inattentiveness, hyperactivity, and/or impulsivity (American Psychiatric Association 2013). Anxiety is a very common co-morbidity in several neurodevelopmental disorders including ADHD. We can measure these characteristics in mice with behavioural tests, like the marble burying test and the open field test. Behavioural tests will be conducted to study changes in behaviour caused by gut microbiota. ADHD is not only characterised by behavioural changes but also by structural and functional brain differences (Weyandt, Swentosky et al. 2013). To cognition we will use neuroimaging

techniques, such as Diffusion Tensor Imaging (DTI), rs fMRI and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS), and histological and biochemical assays. After this we will compare microbial compositions from people with and without ADHD to identify suspect bacterial species for ADHD. In order to study behavioural and cognitive changes as result of specific bacteria we will colonise germ-free mice with specific bacterial species. These germ-free mice will be colonised only with these bacteria, enabling us to study behavioural and neuronal characteristics altered by these specific bacteria. After colonisation we want to examine cognition, behaviour and brain structure. When we see behavioural and/or cognitive changes as result of specific bacteria, we will infect conventionally raised mice with these bacterial species in order to mimic the natural situation.

2. Second, when we were able to induce dysbiosis by microbiota transplantation or by colonisation with specific bacteria, we plan to study the link between gut dysbiosis and neurodevelopment. To study this link we first have to induce gut dysbiosis. We will colonise mice with human ADHD-microbiota or with bacteria shown to be able to alter behaviour and cognition (first component). Inducing dysbiosis by diet or antibiotics is also possible, but inducing dysbiosis by colonising mice with microbiota or bacteria would be the best method as this will be almost instant, long-term, with only a few, mild side-effects. Changing gut microbial composition with diet takes a few months. Antibiotics directly affect mitochondria due to the striking similarities between bacteria and mitochondria, and has side-effects as well. After colonisation we will assess behaviour as well as mitochondrial function. We will also study effects of bacteria known to affect mitochondrial function, for example *Pseudomonas spp.* (Liu, Samuel et al. 2014; Manago, Becker-Flegler et al. 2015) on behaviour, cognition and mitochondrial function.

When no altered mitochondrial function is found we will not measure mitochondrial function in future experiments.

3. Third, we aim to investigate effects of environmental factors on gut microbiota and neurodevelopment. Hereby, we focus on two environmental factors: antibiotics and diet. These two factors are associated with dysbiosis, a significant change in microbial composition. In addition, we aim to study effects of certain diets on the composition of the gut microbiota. Certain long-term diets are able to change gut microbial composition and are capable of impacting cognition and behaviour to a great extent. We plan to expose mice to these environmental factors and consequently assess behaviour and cognition using various imaging, biochemical and physiological assays. The brain is an organ with high plasticity until the end of adolescence (around 3 months). In adulthood (3-6 months) the brain is fully grown, but remains plastic. We expect therefore, that we can still ameliorate symptoms of neurodevelopmental disorders later in life. If we were not able to induce gut dysbiosis in component 1 we will not continue.
4. If we were able to induce gut dysbiosis in component 1, we will design specific intervention studies aiming at re-establishing a healthy microbiota. This should normalise mitochondrial energy production resulting in healthy neurodevelopment. Although diet can cause mitochondrial dysfunction via dysbiosis, these very same environmental factors, chosen carefully, could also normalise gut microbiota and

mitochondrial function promoting healthy neurodevelopment. The exact nature of these interventions will depend on the answers to the three above mentioned components of this project. We will first induce gut dysbiosis either by microbiota transplantation, or by introducing specific bacteria as this will be almost instant, long-term, with only a few, mild side-effects. After we see alterations in behaviour we will give the mice the selected diet. We will again conduct behaviour tests and thereafter we will measure cognition and mitochondrial function.

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

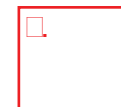
All components of this project are focussed on the link between dysbiosis and neurodevelopmental disorders such as autism and ADHD. We will address the effects of several interventions, such as diet or antimicrobials, on gut microbiota, mitochondrial function, and cognition and behaviour. These experiments will require critical timing as interventions and colonisations need to take place before finalisation of neurodevelopment.

To study this we formulated the following milestones:

1. Gut microbiota has an impact on neurodevelopment and we can identify suspect bacterial species affecting cognition and behaviour.  
*If we observe affected neurodevelopment as result of the gut microbiota, we will explore the role of mitochondria in this process.*
2. Dysbiosis leads to mitochondrial dysfunction.  
*If we were able to demonstrate affected mitochondrial function in these processes, we will also assess mitochondrial function after dietary interventions. If we can show effects of gut microbiota and/or specific bacteria on behaviour and cognition, we will explore effects of diets or antibiotic treatment on gut microbial composition and neurodevelopment.*
3. Environmental factors, such as diet and/or antibiotics, lead to gut dysbiosis and consequently affect neurodevelopment.  
*When we observe effects of environmental factors on dysbiosis and on neurodevelopment, we will design dietary interventions to re-establish a healthy gut microbiota, leading to healthy neurodevelopment.*
4. Mitochondrial energy production and neurodevelopment can be normalised by dietary interventions.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

| Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 1             | Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and behaviour |
| 2             | Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment         |
| 3             | Effects of diet on gut microbiota and neurodevelopment                |
| 4             | Interventions to re-establish a healthy gut microbiota                |



### Format

#### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven.
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

|     |                          |  |
|-----|--------------------------|--|
| 1.1 | Titel van het project    | Effecten van darmbacteriën op ontwikkelingsstoornissen zoals ADHD en autisme spectrum stoornis |
| 1.2 | Looptijd van het project | 8-9-2015 - 8-9-2019  |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | Ontwikkelingsstoornissen, antibiotica, voeding, darmbacteriën                                  |

## 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 Projectbeschrijving

|     |   |  |
|-----|---|--|
| 3.1 | Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Darmbacteriën vervullen belangrijke functies voor het menselijke lichaam. Zo spelen de darmbacteriën een essentiële rol in de werking van het centrale zenuwstelsel. Er zijn aanwijzingen dat verschillende ziektebeelden, waaronder ontwikkelingsstoornissen zoals autismespectrumstoornis (ASS) en ADHD, samengaan met verstoring van de samenstelling van darmbacteriën. Het is nog niet bekend of de verstoring in samenstelling van darmbacteriën oorzaak of gevolg is van de ontwikkelingsstoornissen. Wij willen graag onderzoeken of en hoe de darmbacteriën de breinontwikkeling beïnvloeden. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?         | Complexe ontwikkelingsstoornissen, zoals autisme spectrum stoornis (ASS) en ADHD, worden veroorzaakt door meerdere, complexe factoren. Het aantal mensen dat gediagnosticeerd wordt met complexe ontwikkelingsstoornissen, is de laatste tientallen jaren enorm toegenomen. Er is weinig bekend over oorzaken van verschillende complexe ontwikkelingsstoornissen en op dit moment zijn behandelmethoden beperkt. Wij willen onderzoeken waardoor deze toename veroorzaakt wordt en hopen met deze kennis mogelijke therapeutische behandelingen tegen ontwikkelingsstoornissen te vinden.             |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Voor dit onderzoek zullen in totaal ongeveer 750 muizen gebruikt worden.   |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?   | Gering ongerief als gevolg van wekelijks gedragstesten en kortdurende orale toediening (gavage) van bacteriën. Behandeling met antibiotica veroorzaakt over het algemeen weinig bijwerkingen. Bijwerkingen die relatief vaak voorkomen, zoals diarree, geven vaak geringe, kortdurende, gevolgen voor het welzijn. Muizen kunnen mogelijk gering ongerief ondervinden als gevolg van dieet. Voor MRI-testen wordt algehele anesthesie toegepast waaruit de dieren niet zullen bijkomen.  |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | Gering (90%), matig (10%)  |
| 3.6 | Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | Na afloop worden de dieren gedood en worden de organen voor verder onderzoek gebruikt.   |

## 4 Drie V's

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 4.1 | <b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.    | Meerdere, vaak onbekende, factoren spelen een rol in de ontwikkeling van complexe ontwikkelingsstoornissen. Ook zijn gedrag en cognitie belangrijke parameters om ontwikkelingsstoornissen te onderzoeken. Hiervoor zijn nog geen proefdier vrije alternatieven beschikbaar.   |
| 4.2 | <b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.   | De muizen worden tevens gebruikt in diverse gedrags- en hersenfunctietesten. Er is uitgebreid gezocht in de literatuur of deze experimenten niet al eerder gedaan zijn waardoor deze experimenten overbodig zouden worden. Er zijn geen soortgelijke experimenten gevonden. De variatie tussen de muizen wordt zoveel mogelijk verkleind waardoor minder dieren nodig zijn voor significante verschillen. Als laatste is het minimale benodigde aantal muizen statistisch berekend aan de hand van eerdere soortgelijke studies.   |
| 4.3 | <b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. | In dit project zullen muizen gebruikt worden. Wij willen graag het effect van de darmbacteriën op gedrag en cognitie onderzoeken. Lagere diersoorten, zoals zebrafissen, zijn hier niet voor geschikt. Over muizen is veel kennis beschikbaar en ook zijn veel studies naar de darmbacteriën uitgevoerd in muizen. Hiervan zal gebruik worden gemaakt tijdens dit project waardoor minder dieren nodig voor het optimaliseren van protocollen. Er is gekozen voor experimenten waarvoor zo weinig mogelijk muizen nodig zijn en dieren zo weinig mogelijk lijden. Mensen die deze experimenten uitvoeren zijn ervaren met proefdierwerk. |
| 4.4 | Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.               | Dieren worden gezamenlijk gehuisvest in geschikte kooien om stress door eenzaamheid zoveel mogelijk te voorkomen. Ze zullen onbeperkt toegang hebben tot water en voedsel. Waar nodig zal algehele anesthesie gebruikt worden. Humane eindpunten, de eerste indicatie van ernstig lijden, zijn opgesteld om het leed van de dieren zo veel mogelijk te beperken. De muizen worden dagelijks gecontroleerd op welzijn en zo nodig wordt de dierenarts om advies gevraagd waarna dit advies wordt opgevolgd.   |

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and behaviour</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and behaviour |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |   |
| 1             | Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and 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.

---

In order to study effects of the gut microbiota on neurodevelopment we plan to colonise mice with specific bacterial species or with human microbiota from individuals diagnosed with ADHD. After colonisation we aim to conduct behavioural tests followed by measuring mitochondrial function or performing neuroimaging tests. The general design for this experiment is as follows:

1. Colonisation

2. Behavioural tests

3. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure post mortem brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

All experiments, except neuroimaging and measuring mitochondrial function, will be performed in isolators wherein the mice are housed to prevent colonisation with environmental bacteria. As we house mice in isolators we are restricted in options for behavioural tests. This excludes all equipment requiring power. In addition, we cannot use equipment too large to fit inside the isolators (larger than 45x45cm).

We will colonise mice with microbiota or specific bacteria. We will collect stool samples once a week and sequence bacterial 16S rRNA genes. We will analyse stability of colonisation by comparing the taxonomic profiles of stool samples with the original sample.

Before and after colonisation we will conduct behavioural tests (at most once a week) in order to study behavioural changes after colonisation. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory.

After behavioural tests, mice are randomly divided into two groups: one group will be used for analysis of brain structure and function while the other group will be used to study post mortem brain mitochondrial function. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice. Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning by and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

Before we start with this project, we will practise techniques, such as gavage, neuroimaging, transcardial perfusion, and measuring mitochondrial function, on surplus mice to optimise success rate of these experiments.

This experiment will take maximally 4 weeks. The aim of this experiment is to study effects of the gut microbiota on neurodevelopment. We will first colonise mice with human microbiota or with specific bacteria to study whether gut dysbiosis is a cause of neurodevelopmental disorders. Any dysbiosis present in the donor microbiota will be transferred to the recipient mouse. Most of the bacteria present in gut microbiota cannot be cultured, this makes studying their causal role in disorders technically challenging. After colonisation we will conduct behavioural tests and analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders.

This approach allows us to study effects of gut microbiota on neurodevelopmental disorders. First, we will colonise germ-free mice with human microbiota of specific bacteria. After that, we will study behaviour and cognition to investigate the causality between gut dysbiosis and neurodevelopmental disorders.

All mice will be colonised with a suspension of microbiota or specific bacteria in Phosphate Buffered Saline (PBS) via gavage. By oral force-feeding we can decrease variation as every mouse will receive exactly the same amount of microbiota. Administration of bacterial suspensions via gavage will have a mild, short-term impact on the animals. This procedure will be done once every week in order to reinforce the microbiota and will take about 5 seconds per mouse.

Behavioural tests can possibly cause mild, short-term distress. Tests conducted include the Open Field test, marble burying test, and object recognition test. These tests will be done at most once a week (before and after colonisation) in all mice and will take about 10 minutes each time. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

Brain function and structure, for example investigating cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity, will be examined in one group of mice. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcardial perfusion-fixation using Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcardial

perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis. Mitochondrial function will be measured in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

---

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed under comparable conditions. Introducing microbiota via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. We will first investigate if we are able to alter behaviour and cognition by microbiota transplantation or colonisation with bacteria. When we see behavioural and cognitive changes, we will include a group of mice to measure mitochondrial function. By practising challenging techniques on surplus animals, we will minimise the number of mice required for these experiments.

---

## **B. The animals**

---

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

---

We will use germ-free as well as conventionally raised mice (*Mus musculus*). Germ-free mice, mice without microbiota, are required for colonisation. These mice have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice (3 weeks old), after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala.

Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females. Before we start this project we will practise the required skills with surplus mice. These skills include gavage, MRI scanning, transcatheter perfusion, and measuring mitochondrial function. The maximum number of animals we consider to be necessary to practise is 40 mice in total in this project. We will use test groups (N=14), mice that receive human microbiota or specific bacteria, as well as control groups (N=14), mice receiving a sham treatment. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. The maximum number of animals we consider to be necessary is 224 mice, allowing us to conduct 8 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure as result of microbiota or specific bacterial species. With these 8 experiments we plan to do the following procedures:

- 1 experiment to investigate whether ADHD gut microbiota affects behaviour and cognition in germ-free mice
- 4 experiments to analyse effects of specific bacterial species on behaviour and cognition in germ-free mice followed by:
- 3 experiments to analyse effects of specific bacteria (selected in germ-free mice) species on behaviour and cognition in conventionally raised mice.

The specific bacterial species used will include *Pseudomonas* spp., often found in dairy products, and *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, often used in probiotics.

When behaviour and cognition are altered after colonisation, we will also include a group of mice to assess mitochondrial function (N=10).

Mitochondrial function will be assessed in mice colonised with the microbiota or bacteria shown to be most effective in changing behavioural and cognition. An additional 40 mice is required when mitochondrial function is proven to be affected by dysbiosis.

The total number of animals we consider necessary is 264 mice for this experiment and 40 mice to practise required skills.

| Species                      | Origin   | Maximum number of animals | Life stage |
|------------------------------|--|---------------------------|------------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 304                       | 3 weeks    |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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



- **Replacement:**  
We plan to investigate effects of gut microbiota or specific bacterial species on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- **Reduction:**  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. We will only assess mitochondrial function when we were able to affect behaviour and cognition by colonisation. Mitochondrial function is studied only for microbiota or bacteria shown to be most effective in changing behaviour and cognition.
- **Refinement:**  
Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will either colonise mice with microbiota or introduce specific bacteria. Using one of these methods, introduced gut dysbiosis will be almost instant, long-term and with least side-effects. Inducing dysbiosis with diet will take three months and using antibiotics to promote gut dysbiosis will also introduce side effects. After inducing intestinal dysbiosis we will conduct behavioural tests to assess behavioural changes due to the dysbiosis. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable results. When we see behavioural changes in the animals we will assess cognition in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO2 are known to affect mitochondrial function.

---

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

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

---

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

Negative effects from colonisation with bacteria, mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the colonisation such as hyperactivity and increased anxiety. We know from experience that distress caused by these changes is mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Effects of the microbiota or bacteria on behaviour and cognition are described in literature. Some of the bacteria are known to occasionally cause diarrhoea in humans. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

Transplanting human microbiota to germ-free mice has been done before (Ridaura, Faith et al. 2013; Bruce-Keller, Salbaum et al. 2015) where the researchers studied the role of gut microbiota on obesity. No adverse effects, except a significant increase in weight, were reported. Our goal is to study effects of microbiota from individuals with ADHD on cognition and behaviour in mice. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

---

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 1%.

## **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the colonisation can be classified as mild to moderate. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'.

Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (80%) to moderate (20%)

## **End of experiment**

**L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed by cervical dislocation in order to study brain mitochondrial function and structure. The other group of mice will be sacrificed in order to study brain function and structure.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

|                    |   |  |                    |   |
|--------------------|---|--|--------------------|---|
| 1.1                | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><tr><td>Serial number<br/>2</td><td>Type of animal procedure<br/>Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment</td></tr></table> | Serial number<br>2 | Type of animal procedure<br>Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment |
| Serial number<br>2 | Type of animal procedure<br>Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment                                     |  |                    |   |

## 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.

---

In order to investigate effects of antibiotics on dysbiosis, mitochondrial function and brain development, we will expose mice to these antibiotic-treatments. Some antimicrobial classes are associated with gut dysbiosis and mitochondrial dysfunction. We will use often described antibiotics which possibly affect mitochondrial function, such as fluoroquinolones and aminoglycosides. In order to study effects of environmental effects on gut microbial composition, we will collect stool samples once a week.

After treatment we aim to conduct behavioural tests followed by measuring mitochondrial function or performing neuroimaging tests. The general design for this experiment is as follows:

1. Treatment of conventionally raised mice with antibiotics

2. Behavioural tests

3. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure *ex vivo* brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

Before and after treatment with antibiotics we will conduct behavioural tests in order to study behavioural changes after colonisation. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory.

After behavioural tests, mice are randomly divided into two groups: one group will be used for analysis of brain structure and function while the other group will be used to study brain mitochondrial function. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice.

Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

This experiment will take maximally 5 weeks. The aim of this experiment is to study effects of antibiotics on gut dysbiosis and neurodevelopment. We will use conventionally raised mice, mice with normal gut microbiota. We will administer antibiotics via drinking water. We will select antibiotics known to affect mitochondrial function and often administered. To investigate effects of antimicrobials on neurodevelopment, we will conduct behavioural tests and analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders.

This approach allows us to study effects of antibiotics on neurodevelopmental disorders. We will administer antibiotics to mice with normal gut microbiota. After that, we will study behaviour and cognition to investigate whether antibiotic-treatments affect neurodevelopment.

All mice will be treated with antibiotics, such as fluoroquinolones, via drinking water. We will introduce these antimicrobial interventions to induce gut dysbiosis and after one month on antibiotic-treatment we will examine behaviour, brain structure, and brain function with behavioural studies and neuroimaging techniques. Every week (before and after treatment) stool samples will be collected to analyse microbial composition.

Behavioural tests, for example the Open Field test, the Marble Burying test, and the object recognition test, can possibly cause mild, short-term distress. These tests will be done at most once a week (before and after colonisation) in all mice and will take about 10 minutes each time. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

Brain function and structure, for example investigating cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity, will be examined in one group of mice. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcardial perfusion-fixation using 1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcardial perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis.

Mitochondrial function will be measured in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

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

---



Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed in comparable conditions. Introducing microbiota via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. All experiments are performed by experienced researchers or technicians.

We will carefully select potential antibiotics in order to minimise the groups of mice needed for this experiment. Mitochondrial function will be measured only when we were able to show altered mitochondrial function in the previous experiment (animal procedure 1), or when we see behavioural and/or cognitive changes after antibiotic-treatment.

## B. The animals

---

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

---

We will use conventionally raised mice (*Mus musculus*). These conventionally raised mice, mice with normal microbiota, have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice, after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala. Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females.

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. We will use test groups ( $N=14$ ), mice that receive antibiotics associated with mitochondrial dysfunction, as well as control groups ( $N=14$ ). The maximum number of animals we consider to be necessary is 140 mice, allowing us to conduct 5 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure as result of treatment with antibiotics. With these 5 experiments we plan to study effects of five selected classes of antibiotics, including aminoglycosides, beta-lactam, chloramphenicol, fluoroquinolones and oxazolidinones. We start with three of these classes that are most often administered to young children or pregnant women. When we don't see effects of these three classes of antibiotics we will end this experiment.

When behaviour and cognition are altered after antibiotic-treatment, we will also use a group of mice to assess mitochondrial function ( $N=10$ ). Mitochondrial function will be assessed in mice treated with antibiotics shown to be most effective in changing behavioural and cognition. An additional 40 mice is required when behavioural and cognition are proven to be affected by dysbiosis. The total number of animals we consider necessary is 180 mice for this experiment.

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

|                              |  |     |         |
|------------------------------|--|-----|---------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 180 | 3 weeks |
|------------------------------|--|-----|---------|

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

- Replacement:  
We plan to investigate effects of gut dysbiosis on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- Reduction:  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. We will only assess mitochondrial function when we were able to affect behaviour and cognition by antibiotics or when mitochondrial function is shown to be affected in animal procedure 1. Mitochondrial

function is studied only for antibiotics shown to be most effective in changing behaviour and cognition.

- Refinement:

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will administer mice antibiotics associated with affected neurodevelopment. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable results. When we see behavioural changes in the animals we will assess cognition in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO<sub>2</sub> are known to affect mitochondrial function.

---

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

---

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane. Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

## F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

## G. Location where the animals procedures are performed

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

# Classification of discomfort/humane endpoints

## H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

---

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

---

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

---

Mild side-effects from antibiotic treatment, mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the antibiotics such as hyperactivity and increased anxiety. We know from experience that distress caused by these changes is mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Antibacterials commonly cause some side-effects as antibiotics can destroy commensal bacteria living in the host. Our goal is to study effects of diet or usage of antibiotics on cognition and behaviour in mice. We expect to see behavioural and cognitive changes. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

Occurrence of side-effects from antibiotics cannot be prevented. These potential effects are considered to be mild with no significant impairment of the well-being or general condition. Humane endpoints are adopted to minimise severity. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

---

**J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 5%.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the antibiotics can be classified as mild. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'. Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (100%).

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

---

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed by cervical dislocation in order to study brain mitochondrial function and structure. The other group of mice will be sacrificed in order to study brain function and structure.

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

---

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>3                         | Type of animal procedure<br>Effects of diet on gut microbiota and neurodevelopment |



## 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.

---

In order to investigate effects of diet on dysbiosis, mitochondrial function and brain development, we will expose mice to these dietary interventions. Certain diets are able to impact cognition and behaviour to a great extent. Diets selected in this experiment are associated with neurodevelopment, for example high fat or high sugar diets. In addition, we will also study effect of diets considered healthy like diets high in omega-3 or carbohydrates. In order to study effects of diet on gut microbial composition, we will collect stool samples once a week.

After treatment we aim to conduct behavioural tests followed by measuring mitochondrial function or performing neuroimaging tests. The general design for this experiment is as follows:

1. Diet conventionally raised mice
2. Behavioural tests
3. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure *ex vivo* brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

Before and after treatment with diets we will conduct behavioural tests in order to study behavioural changes after colonisation. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory.

After behavioural tests, mice are randomly divided into two groups: one group will be used for analysis of brain structure and function while the other group will be used to study brain mitochondrial function. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice.

Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

This experiment will take maximally 3 months. The aim of this experiment is to study effects of diet on gut dysbiosis and neurodevelopment. We will use conventionally raised mice, mice with normal gut microbiota. We will give mice diets associated with neurodevelopment, for example high fat or high sugar diets. To investigate effects of diet on neurodevelopment, we will conduct behavioural tests and analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders.

This approach allows us to study effects of diet on neurodevelopmental disorders. We will give mice diet and after three months we will study behaviour and cognition to investigate whether diet affects neurodevelopment.

All mice will be fed special diets, for example high saturated fat and high caloric/sucrose diets or diets with unsaturated fatty acids. We will introduce these dietary interventions to induce gut dysbiosis and after three months on the diets we will examine behaviour, brain structure, and brain function with behavioural studies and neuroimaging techniques. Every week (before and after treatment) stool samples will be collected to analyse microbial composition.

Behavioural tests can possibly cause mild, short-term distress. Tests conducted include the Open Field test, marble burying test, and object recognition test. These tests will be done at most once a week (before and after colonisation) in all mice and will take about 10 minutes each time. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

Brain function and structure, for example investigating cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity, will be examined in one group of mice. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcardial perfusion-fixation using 1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcardial perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis. Mitochondrial function will be measured in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed in comparable conditions. Introducing microbiota

via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. All experiments are performed by experienced researchers or technicians.

We will carefully select potential diets in order to minimise the groups of mice required for this experiment. Mitochondrial function will be measured only when we were able to show altered mitochondrial function in the previous experiment (animal procedure 1), or when we see behavioural and/or cognitive changes after diets.

## B. The animals

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

We will use conventionally raised mice (*Mus musculus*). These conventionally raised mice, mice with normal microbiota, have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice, after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala. Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females.

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. We will use test groups ( $N = 14$ ), mice that receive diets associated with neurodevelopmental disorders, as well as control groups ( $N = 14$ ), mice given healthy diets. The maximum number of animals we consider to be necessary is 112 mice, allowing us to conduct 4 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure as result of diet. With these four experiments we plan to study effects of four selected diets, including diets with high saturated or unsaturated fatty acids and high calorie/sugar diets.

When behaviour and cognition are altered after diet, we will also use a group of mice to assess mitochondrial function ( $N = 10$ ). Mitochondrial function will be assessed in mice given diets shown to be most effective in changing behavioural and cognition. An additional 40 mice is required when behavioural and cognition are proven to be affected by dysbiosis. The total number of animals we consider necessary is 152 mice for this experiment.

| Species                      | Origin   | Maximum number of animals | Life stage |
|------------------------------|--|---------------------------|------------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 152                       | 3 weeks    |

## C. Re-use

---

**C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

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

---

---

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

---

No

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

---

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

- Replacement:  
We plan to investigate effects of gut dysbiosis on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- Reduction:  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. We will only assess mitochondrial function when we were able to affect behaviour and cognition by diet or when mitochondrial function is shown to be affected in animal procedure 1. Mitochondrial function is studied only for antibiotics shown to be most effective in changing behaviour and cognition.
- Refinement:  
Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will give mice diets associated with affected neurodevelopment. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable

results. When we see behavioural changes in the animals we will assess cognition in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO2 are known to affect mitochondrial function.

---

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

---

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

## **F. Accommodation and care**

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

---

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

# **Classification of discomfort/humane endpoints**

## **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

---

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

Some diets can cause mild distress. Mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the induced dysbiosis such as hyperactivity and increased anxiety. We know from experience that distress caused by these changes is mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Feeding mice modified diets, that do not meet all of the nutritional needs are expected to cause mild distress. Our goal is to study effects of diet on cognition and behaviour in mice. We expect to see behavioural and cognitive changes. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

We will prefer to use diets that do meet all of the animals' nutritional needs to prevent distress. Potential effects from diets are considered to be mild with no significant impairment of the well-being or general condition within the time-scale of this study. Humane endpoints are adopted to minimise severity. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

### **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 1%.

#### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the diets can be classified as mild. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'. Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (100%)

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed by cervical dislocation in order to study brain mitochondrial function and structure. The other group of mice will be sacrificed in order to study brain function and structure.

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

---

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

---

Yes

---



## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Interventions to re-establish a healthy gut microbiota</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 4 | Interventions to re-establish a healthy gut microbiota |
| Serial number | Type of animal procedure  |  |               |                          |   |  |
| 4             | Interventions to re-establish a healthy gut microbiota  |  |               |                          |   |  |

## 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 carry out this experiment only when we see changes in behaviour and cognition after introducing antibiotics, diet or gut microbiota from ADHD individuals (previous describes animal procedures). The exact nature of this experiment largely depends on outcomes of previous experiments.

The brain is an organ with high plasticity. Therefore we plan to design dietary intervention studies to re-establish a healthy gut microbiota, thereby normalising mitochondrial energy production resulting in healthy neurodevelopment. We aim to ameliorate certain characteristics of developmental disorders, such as anxiety and abnormal motor activity. The general design for this experiment is as follows:

1. Introducing intestinal dysbiosis either by microbiota transplantation, or introducing specific bacteria (animals procedure 1)
2. Behavioural tests
3. Treatment of gut dysbiosis either by diet or probiotics (animal procedure 3)
4. Behavioural tests
5. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure *ex vivo* brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

All experiments, except neuroimaging and measuring mitochondrial function, will be performed in isolators wherein the mice are housed to prevent colonisation with environmental bacteria. As we house mice in isolators we are restricted in options for behavioural tests. This excludes all equipment requiring power. In addition, we cannot use equipment too large to fit inside the isolators (larger than 45x45cm)

We will first introduce gut dysbiosis in mice. When we were successful in transmitting the ADHD-phenotype from humans to mice (animal procedure 1), we will introduce gut dysbiosis by microbiota transplantation. When we were unsuccessful, we will introduce specific bacteria able to change behaviour and cognition to conventionally raised mice (animal procedure 1).

After introducing dysbiosis, we will conduct behavioural tests to investigate effects of dysbiosis on behaviour. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried

marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spend to explore the new object provides an index of recognition memory. When we see changes in behaviour, we will treat these mice with diet. The exact nature of the diet used will depend on the results of animal procedure 3. After dietary intervention, we will conduct behavioural tests to see if the diet is able to ameliorate changes in behaviour. We will focus on brain structure and function first. When we see changes in behaviour, brain structure, and brain function as result of one or more treatments, we will study mitochondrial function as well. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging to study brain function, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice. Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

This experiment will take maximally 4 months. The aim of this experiment is to design dietary interventions able to normalise gut microbial composition and neurodevelopment. To study possible interventions, we first have to induce dysbiosis. We will do this by colonisation of mice with human microbiota or with specific bacteria. Any dysbiosis present in the donor microbiota will be transferred to the recipient mouse. We plan to use microbiota transplantation or by introduction of bacteria as method to change microbial composition, because introduced gut dysbiosis will be almost instant, long-term and with least side-effects. Inducing dysbiosis with diet will take three months and using antibiotics to promote gut dysbiosis will also introduce side effects. After colonisation we will conduct behavioural tests to study alterations in behaviour caused by dysbiosis. We then will give mice diets selected in animal procedure 3. We will again conduct behavioural tests to see if these diets are able to modify behaviour. Finally we will analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders. This approach allows us to study dietary interventions to ameliorate traits of neurodevelopmental disorders. First, neurodevelopmental disorders are mimiced by inducing dysbiosis leading to altered behaviour and cognition. We then try to ameliorate these symptoms by giving mice high potential diets (selected in the third animal procedure).

In order to design interventions to ameliorate effects of the gut dysbiosis on neurodevelopment and function we first aim to induce gut dysbiosis in conventionally raised mice. First, we will induce intestinal dysbiosis either by transplantation of microbiota from individuals with ADHD transplantation to mice, or by introducing specific bacteria. When we were succesfull in transferring the ADHD-phenotype from individuals to mice, we will transplant germ-free mice with human microbiota. When we were unsuccessfull, we will introduce specific bacteria (see animal procedure 2) which were able to affect behaviour and cognition. We will colonise mice with a suspension of microbiota or bacteria in Phosphate Buffered Saline (PBS) via gavage. By oral administration, we can decrease variation as every mouse will receive exactly the same amount of

microbiota. Administration of bacterial suspensions via gavage will have a mild, short-term impact on the animals. This procedure will be done once and will take about 5 seconds per mouse.

After inducing dysbiosis, we will conduct behavioural tests (before and after inducing dysbiosis) which will take about 10 minutes each time. Behavioural tests can possibly cause mild, short-term distress. Tests conducted include the Open Field test, marble burying test, and object recognition test. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

When we see behavioural changes, we will treat mice with dietary interventions to ameliorate those symptoms using diets. The exact nature of the diet is dependent on outcomes of previous experiments (animal procedure 3). For example, we will give diets containing high saturated fat or unsaturated fatty acids, high caloric/sucrose, or diets containing probiotics. Mice will be fed diets ad libitum for approximately 3 months. During dietary intervention, we will conduct behavioural tests once a week to assess behavioural changes. We will use the same behavioural tests described above.

Three months after starting on the diet, we will investigate brain function and structure in one group of mice. For this, we will examine cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcatheter perfusion-fixation using Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcatheter perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis.

Only when we have seen altered mitochondrial function as result of dysbiosis (animal procedure 1-3) we will examine mitochondrial function in this experiment. In order to study whether dietary interventions are able to normalise brain mitochondrial function, we will measure mitochondrial function in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

---

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed in comparable conditions. Introducing microbiota via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. All experiments are performed by experienced researchers or technicians. This experiment is only carried out when we were successful in transferring the ADHD-phenotype from humans to mice (animal procedure 1), or when we were able to alter behaviour and cognition by introducing specific bacteria (animal procedure 2). Mitochondrial function will be measured only

when mitochondrial function is proven to be affected by dysbiosis in previous experiments (animal procedure 1-3). Measuring mitochondrial function will only be performed in mice given the diet with the highest potential in affecting behaviour and cognition.

## B. The animals

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

We will use germ-free mice (*Mus musculus*). Germ-free mice, mice without microbiota, are required for colonisation. These mice have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice, after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala. Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females.

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. The number of groups of mice used for this experiment depends on how many diets show potential in animal procedure 4. We will start with the diets showing highest potential in affecting behaviour and cognition. We will use test groups ( $N=14$ ), as well as control groups ( $N=14$ ). The maximum number of animals we consider to be necessary is 112 mice, allowing us to conduct 4 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure. When mitochondrial function is altered in previous experiments, we will also use a group of mice to assess mitochondrial function ( $N=10$ ). Measuring mitochondrial function will only be performed in mice given the diet with the highest potential in affecting behaviour and cognition. An additional 20 mice is required when mitochondrial function is proven to be affected by dysbiosis. The total number of animals we consider necessary is 132 mice for this experiment.

| Species                      | Origin   | Maximum number of animals | Life stage |
|------------------------------|--|---------------------------|------------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 132                       | 3 weeks    |

## C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

- Replacement:  
We plan to investigate effects of gut dysbiosis on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- Reduction:  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. This experiment is only carried out when previous experiments (animal procedures 1, 2, 4) were successful. We will only assess diets that were proven to be able to affect behaviour and cognition in animal procedure 4. Diets with the highest potentials are investigated first. We will only measure mitochondrial function in these mice when we demonstrated altered mitochondrial function in previous experiments. For mitochondrial function, we will only assess the diet most affecting behaviour and cognition.
- Refinement:  
Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Before we are able to ameliorate symptoms of neurodevelopmental disorders, we first have to induce them. In animal procedure 1 and 2 we will investigate the most appropriate method for inducing gut dysbiosis. We will either colonise mice with microbiota or introduce specific bacteria. Using one of these methods, introduced gut dysbiosis will be almost instant, long-term and with least side-effects. Inducing dysbiosis with diet will take three months and using antibiotics to promote gut dysbiosis will also introduce side effects. After inducing intestinal dysbiosis we will conduct behavioural tests to assess behavioural changes due to the dysbiosis. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable results. When we see behavioural changes in the animals we will try to ameliorate these changes by treating the

mice with dietary interventions. These interventions are chosen carefully in animal procedure 4. A group of control mice is given normal chow. Changes in behavioural are measured by the same behavioural tests used before the treatment. Finally cognition is assessed in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO2 are known to affect mitochondrial function.

---

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

---

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

---

**F. Accommodation and care**

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

**H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

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

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



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

---

Negative effects from colonisation with bacteria, mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the microbiota such as hyperactivity and increased anxiety. Distress caused by these behavioural changes are considered to be mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Effects of the microbiota or bacteria on behaviour and cognition are described in literature. Some of the bacteria are known to occasionally cause diarrhoea in humans. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

Transplanting human microbiota to germ-free mice has been done before (Ridaura, Faith et al. 2013; Bruce-Keller, Salbaum et al. 2015) where the researchers studied the role of gut microbiota on obesity. No adverse effects, except a significant increase in weight, were reported. Our goal is to study effects of microbiota from individuals with ADHD on cognition and behaviour in mice. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 1%.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the colonisation can be classified as mild to moderate. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'.

Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (80%) to moderate (20%)

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed in order to study brain function and structure, or brain mitochondrial function and structure.

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

---

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

---

Yes

---



## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0077
2. Titel van het project: Elucidating the link between gut dysbiosis and mitochondrial dysfunction leading to neurodevelopmental disorders.
3. Titel van de NTS: Effecten van darmbacteriën op ontwikkelingsstoornissen zoals ADHD en autisme spectrum stoornis.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 23-04-2015
  - in vergadering besproken: 12-05-2015
  - vragen gesteld: 18-05-2015
  - antwoorden en aangepaste aanvraag ontvangen op 22-05-2015
  - in vergadering herbesproken: 02-06-2015
  - aanvraag compleet 02-06-2015
  - anderszins behandeld: aangepaste aanvraag en finaal advies zijn op 29 juli 2015 in een schriftelijke e-mailronde voorgelegd aan de DEC-leden voor instemming.
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
  - advies aan CCD: 07-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 18-05-2015
  - Strekking van de vragen:
  - **Project Proposal:**
    - 3.1 De onderzoekers postuleren dat verstoring van de darmflora op jonge leeftijd bijdraagt aan het ontstaan van ontwikkelingsstoornissen via dysfunctionerende mitochondria. De relatie tussen dysfunctionerende mitochondria en het ontstaan van ontwikkelingsstoornissen is aannemelijk gemaakt. De commissie vindt de aanwijzingen voor het effect van

darmbacteriën op mitochondria niet erg overtuigend. Is er meer evidentie te vinden voor deze relatie?

- 3.4 Kiemvrije muizen hebben geen darmflora. Is er een effect op de hersenontwikkeling bij deze dieren, die leidt tot gedragsstoornissen? Zo nee, hoe past dit dan in uw hypothese? Is er evidentie dat de darmflora verschilt tussen mensen met ADHD en mensen zonder ADHD, en voor welke bacteriën verschilt dit? Waarom gebruiken de onderzoekers geen normale muizen waarop zij selectieve darmcontaminatie kunnen toepassen? In onderdeel 4 willen de onderzoekers de geïnduceerde ontwikkelingsstoornis behandelen met een dieet. Zoals beschreven duurt het langer voordat een dieet effect heeft op de samenstelling van de darmflora, waardoor de ontwikkeling van de muizenhersenen al is afgerond. Verwachten de onderzoekers dat zij met een dieet de ontwikkelingsstoornis op termijn kunnen genezen?

**- Description of Animal Procedures:**

- DAP 1, onderdeel A eerste vraag: De onderbouwing voor het gebruik van de marble burying en de object recognition test ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit in alle dierproeven (1-4) aan te passen.
- DAP 1, onderdeel A tweede vraag: Wat is de maximale lengte van het experiment voor de dieren? Hoe gaan de onderzoekers de functie en structuur van mitochondria bestuderen en welke weefsels willen zij daarvoor gebruiken? De onderzoekers worden verzocht dit in alle dierproeven aan te passen.
- DAP 1-3, onderdeel B: De onderzoekers gebruiken muizen van 3 weken oud, waarin een belangrijk deel van de hersenontwikkeling al heeft plaatsgevonden. Waarom starten zij het experiment niet vanaf de geboorte van de muizen? Kunnen de onderzoekers de aantallen dieren beter onderbouwen met behulp van het beoogde experimentele design? Kunnen zij beter uitleggen waarom zij respectievelijk 8, 5 en 4 experimenten willen doen?
- DAP 2 en 3, onderdeel K: 20% van de muizen zal matig ongerief ervaren. Dit blijkt niet uit de gegeven beschrijving van het ongerief dat door de verschillende handelingen wordt veroorzaakt. Indien alle dieren licht ongerief zullen ervaren, dan worden de onderzoekers verzocht de percentages aan te passen, en indien nodig ook in de niet-technische samenvatting.
- DAP 3, onderdeel A tweede vraag: Uit de gegeven beschrijving blijkt niet duidelijk hoe vaak de dieren de gedragstesten ondergaan: alleen bij de start en na drie maanden, of vaker? Er is sprake van gedragstesten voor en na kolonisatie, maar in dit experiment vindt geen kolonisatie plaats. Kunnen de onderzoekers toelichten waarom zij het dieet zo lang geven, wanneer er al na 3 weken effecten te meten zijn zoals in proef 1. Indien het zo lang duurt voordat het dieet effect heeft, verwachten de onderzoekers dan nog een effect op hersenontwikkeling? Wanneer zijn de hersenen van muizen volgroeid?
- DAP4, onderdeel A eerste vraag: Verwachten de onderzoekers dat een ontwikkelingsstoornis een reversibele afwijking is die genezen kan worden door te interveniëren met een dieet? De onderzoekers worden gevraagd dit duidelijker uit te leggen.
- DAP4, onderdeel A tweede vraag: De experimentele handelingen zijn hier preciezer omschreven. De onderzoekers worden verzocht dit ook te doen voor de andere dierproeven.

- Datum antwoord: 22-05-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Project proposal**

- 3.1. In de achtergrond van het projectvoorstel beschrijven wij de context van ons voorstel. Hier schrijven wij dat verstoring van darmmicrobiota op jonge leeftijd effecten heeft op ontwikkeling van het brein. Onze hypothese hierbij is dat de darmmicrobiota communiceert met het brein, onder andere via mitochondriën. Darmbacteriën produceren korte-keten vetzuren (Short-chain fatty acids; SCFA's) voornamelijk door fermentatie van koolhydraten. Wanneer de samenstelling van de darmmicrobiota verandert kan ook de samenstelling van microbiële metaboliëten veranderen. De SCFA's worden opgenomen door darmepitheelcellen en kunnen door de bloedstroom vervoerd worden naar andere organen en weefsels. De commissie vindt deze aanwijzing voor het effect van darmmicrobiota op mitochondriën niet overtuigend. Wij zijn het er met de commissie eens dat dit punt niet erg duidelijk is en daarom hebben wij dit punt toegelicht in het projectvoorstel. Wij beschrijven hier drie aanwijzingen voor effecten van darmbacteriën op mitochondriën:

1. Azijnzuur, propionzuur en boterzuur zijn de voornaamste korte-keten vetzuren geproduceerd door darmbacteriën. Deze SCFA's kunnen omgezet worden in de citroenzuurcyclus tot energierijke metaboliëten (ATP, NADH en FAD) in mitochondriën. Boterzuur wordt voornamelijk gebruikt als energiebron voor cellen in de dikke darm. Azijnzuur en propionzuur worden getransporteerd naar andere delen van het lichaam. Azijnzuur wordt gebruikt door mitochondriën voor de synthese van lange-keten vetzuren (Christ, E.J. (1968) Fatty acid synthesis in mitochondria. Elongation of short-chain fatty acids and formation of unsaturated long-chain fatty acids. *Biochimica et biophysica acta*, **152**, 50-62, ibid. ). Propionzuur wordt voornamelijk gebruikt als substraat voor gluconeogenese, een proces dat in de mitochondriën begint. Toediening van propionzuur aan ratten leidt tot cognitieve gebreken, verminderde sociale interacties, repetitief gedrag en abnormale motorische bewegingen (Shultz, S.R., MacFabe, D.F., Ossenkopp, K.P., Scratch, S., Whelan, J., Taylor, R. & Cain, D.P. (2008) Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology*, **54**, 901-911). De vetzuren die worden gemaakt door darmbacteriën vervullen elk verschillende functies. Een veranderde samenstelling van bacteriën in de darmen kan leiden tot een veranderde samenstelling van geproduceerde SCFA's.
2. SCFA's kunnen de werking van mitochondriën ook aantasten. Bijvoorbeeld apoptose te induceren in kankercellen van de dikke darm (Heerdt, B.G., Houston, M.A. & Augenlicht, L.H. (1997) Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell growth & differentiation : the molecular biology Journal of the American Association for Cancer Research*, **8**, 523-532.).
3. Bovendien kunnen bacteriesoorten, zoals verschillende soorten *Pseudomonas*, de mitochondriële functie rechtstreeks aantasten door de mitochondriële surveillance pathway uit te schakelen. Mitochondriën, een rijke bron van cellulair ijzer, zijn aantrekkelijke doelwitten voor bacteriën aangezien vrij ijzer nauwelijks voorkomt in de bloedbaan (Huang, M.L., Lane, D.J. & Richardson, D.R. (2011) Mitochondrial mayhem: the mitochondrial iron modulator of iron metabolism and its role in disease. *Antioxidants & redox signaling*, **15**, 3003-3019.) IJzer is noodzakelijk voor processen zoals DNA-replicatie en metabolisme. Door het blokkeren van de surveillance pathway zijn andere virulentiefactoren zoals sideroforen, ijzer-bindende moleculen, effectiever in het aanvallen en daarmee verkrijgen van ijzer uit mitochondriën (Liu, Y., Samuel, B.S., Breen, P.C. & Ruvkun, G. (2014) Caenorhabditis elegans pathways that surveil and defend mitochondria. *Nature*, **508**, 406-410.). *Pseudomonas spp.*

- zijn psychrotrophen, bacteriën die vermenigvuldigen bij lage temperaturen (0-4°C.). Deze bacteriën worden vaak aangetroffen in melk en melkproducten. Wij veronderstellen dat mensen deze bacteriën meer binnen krijgen dan tientallen jaren geleden doordat mensen deze producten vaker en langer bewaren in de koelkast dan enkele tientallen jaren geleden. Daarom willen wij de effecten van deze psychrotrophe bacteriën, zoals *Pseudomonas spp.*, *Lactobacilus* en *Bifidobacterium*, op mitochondriën en breinontwikkeling onderzoeken.
- 3.4 Kiemvrije muizen vertonen abnormale breinfunctie en gedrag. Deze muizen vertonen bijvoorbeeld een abnormale reactie op stress. Deze stressreactie kan gecorrigeerd worden door de muizen te koloniseren met normale darmmicrobiota (Diaz Hejitz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forssberg, H. & Pettersson, S. (2011) Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 3047-3052, en Sudo, N., Chida, Y., Alba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.N., Kubo, C. & Koga, Y. (2004) Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *The Journal of physiology*, **558**, 263-275). Ook hebben de darmbacteriën invloed op de ontwikkeling van het brein. Desbonnet *et al.* hebben volwassen muizen (55 tot 80 dagen oud) behandeld met een combinatie van verschillende antibiotica. De bacteriële diversiteit in de darmen werd hierdoor significant verminderd. In deze muizen was de cognitieve functie aangetast en konden de muizen minder goed onderscheid maken tussen bekende en onbekende voorwerpen. In het brein werd minder brain-derived neurotrophic factor (BDNF) aangemaakt, een zenuwcelstimulerende factor. BDNF speelt een belangrijke rol bij de vorming van nieuwe synapsen en is van belang voor cognitie ( Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R.D., Cotter, P.D., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2015) Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, behavior, and immunity* ). Kiemvrije muizen vertonen een vergelijkbaar fenotype. Deze tekst hebben wij toegevoegd aan het voorstel.
  - Er is nog weinig onderzoek gedaan naar de darmmicrobiota van mensen met ADHD. Echter, uit persoonlijke communicatie met onze samenwerkende partners in dit onderzoek(naschrift ambtelijk secretaris: namen bekend bij de DEC) weten wij dat er verschillen zijn in samenstelling van darmmicrobiota tussen mensen met en mensen zonder ADHD. Deze bevindingen worden nu opgeschreven en daarna pas vrijgegeven. Daarnaast zijn er veel publicaties over de veranderde samenstelling van darmbacteriën in mensen met autisme. Onlangs is er een artikel gepubliceerd van Pätty *et al.* waarin de auteurs beschrijven dat de darmmicrobiota van kinderen met ADHD anders is dan de darmmicrobiota van kinderen zonder ADHD. Zij beschrijven een vermindering van *Bifidobacterium* species in kinderen met ADHD (Partty, A., Kalliomaki, M., Wacklin, P., Salminen, S. & Isolauri, E. (2015) A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: a randomized trial. *Pediatric research* ). Tot nu toe is dit de enige studie gedaan naar de darmmicrobiota van mensen met ADHD.
  - De commissie vraagt zich af waarom wij darmmicrobiota willen toedienen aan kiemvrije muizen in plaats van aan muizen met normale darmmicrobiota. Wij willen allereerst onderzoeken of wij gedrag en cognitie kunnen veranderen door kolonisatie met bepaalde darmmicrobiota. Gebruik van muizen met normale darmmicrobiota heeft als voordeel dat

deze muizen geen abnormale breinfunctie en gedrag vertonen zoals mogelijk de kiemvrije muizen. Het nadeel is dat deze muizen van zichzelf al een darmmicrobiota bezitten. Deze bestaande darmbacteriën zullen dan gaan concurreren met de toegevoegde microbiota en na verloop van tijd zal er een evenwicht ontstaan tussen bestaande en toegevoegde bacteriën. Hierdoor is het de vraag of wij effecten zullen zien van de toegevoegde darmbacteriën. Gebruik van kiemvrije muizen heeft als voordeel dat muizen ‘schoon zijn’ en binnen een korte tijd (1-3 dagen) gekoloniseerd zijn met de toegevoegde microbiota. Veranderingen in gedrag zijn gevolg van deze kolonisatie. Wij hebben deze motivatie voor het gebruik van kiemvrije dieren toegevoegd aan het voorstel. Wij willen ook het effect van bepaalde bacteriesoorten op gedrag en cognitie onderzoeken. Hiervoor willen we in eerste instantie ook kiemvrije muizen gebruiken om te onderzoeken wat het effect is van deze specifieke bacteriesoorten. Wanneer wij resultaat zien willen wij muizen met normale darmmicrobiota infecteren met deze bacteriesoorten om de natuurlijke situatie beter na te bootsen. Dit hebben wij ook aangepast in de aanvraag.

- In het projectvoorstel zijn wij van plan om ontwikkelingsstoornissen te induceren in muizen. Deze geïnduceerde ontwikkelingsstoornis willen wij vervolgens behandelen door middel van een dieet. De dierexperimentencommissie vraagt zich af of de ontwikkeling van de hersenen niet al is afgerond op het moment dat wij beginnen met de behandeling. Voeding heeft grote invloed op de darmmicrobiota en daarmee ook op de ontwikkeling van het brein. (Bos, D.J., Oranje, B., Veerhoek, E.S., Van Diepen, R.M., Weusten, J.M., Demmelmaier, H., Koletzko, B., de Sain-van der Velden, M.G., Eilander, A., Hoeksma, M. & Durston, S. (2015) Reduced Symptoms of Inattention after Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation in Boys with and without Attention Deficit/Hyperactivity Disorder. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*; Janssen, C.I., Zerbi, V., Mutsaers, M.P., de Jong, B.S., Wiesmann, M., Arnoldussen, I.A., Geenen, B., Heerschap, A., Muskiet, F.A., Jouini, Z.E., van Tol, E.A., Gross, G., Homberg, J.R., Berg, B.M. & Kiliaan, A.J. (2015) Impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on cognition, motor skills and hippocampal neurogenesis in developing C57BL/6J mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, **26**, 24-35; Voreades, N., Kozil, A. & Weir, T.L. (2014) Diet and the development of the human intestinal microbiome. *Frontiers in microbiology*, **5**, 494.). Desbonnet *et al.* hebben volwassen muizen (55 tot 80 dagen oud) behandeld met een combinatie van verschillende antibiotica. De auteurs beschrijven een aangetaste cognitieve functie in deze muizen (Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O’Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R.D., Cotter, P.D., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2015) Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, behavior, and immunity*). Het brein is een plastisch orgaan, hersencellen blijven zich aanpassen aan externe en interne stimuli. Wij verwachten dat wij door middel van dieet bepaalde symptomen van ontwikkelingsstoornissen, zoals angst en abnormale bewegingsactiviteit, te kunnen verminderen.

#### - **Description of Animal Procedures**

- DAP1, onderdeel A eerste vraag: Hartelijk dank voor deze opmerzaamheid. Wij hebben de onderbouwing voor de marble burying test en de object recognition test toegevoegd aan de dierexperimenten.

- DAP 1, onderdeel A tweede vraag: De commissie vraagt zich af wat de maximale duur van dit experiment zal zijn. In deze procedure worden de kiemvrije dieren gekoloniseerd met darmmicrobiota ofwel specifieke bacteriën. Na kolonisatie worden gedragstesten afgenomen en aan het einde van het experiment wordt cognitie onderzocht door middel van MRI. De maximale lengte van dit experiment zal vier weken zijn.
- De muizen zullen worden geofferd via cervicale dislocatie waarna mitochondriële functie en structuur onderzocht zullen worden in het hersenweefsel. Mitochondriële functie zal worden onderzocht door protocollen die hier op de afdeling veel gebruikt worden. Deze protocollen omvatten testen voor respiratie, complex I-IV activiteit, mitochondrieel membraan potentiaal en ATP/ADP levels. Mitochondriële structuur wordt door histochemische technieken onderzocht in gefixeerd hersenweefsel. Al deze testen worden post mortem uitgevoerd.
- DAP 1-3, onderdeel B: Wij vinden dat de commissie hier gelijk heeft qua breinontwikkeling en dat het gebruik van jongere muizen voorkeur geniet. Wij willen echter muizen van ongeveer 3 weken oud gebruiken voor dit experiment omdat gavage bij jongere dieren lastig is en tot hoger ongerief leidt dan bij muizen van 3 weken oud. Gavage is de voorkeursmethode voor het toedienen van darmmicrobiota om de variatie zo klein mogelijk te houden. Hierdoor zijn minder muizen nodig. Wij starten de experimenten in muizen van drie weken oud, dit is voor het begin van de adolescentie (begint omstreeks 6-7 weken). In deze periode is het brein nog heel plastisch: er vindt een overproductie van axonen en synapsen plaats en een toename in dichtheid van connecties tussen de amygdala and prefrontale cortex (Casey, B.J., Getz, S. & Galvan, A. (2008) The adolescent brain. *Developmental review* : *DR*, **28**, 62-77.) Uit andere onderzoeken blijkt dat antibioticagebruik of dieet ook op latere leeftijd nog effecten heeft op breinfunctie (Desbonnet, L., Clarke, G., Traplin, A., O'Sullivan, O., Crispie, F., Moloney, R.D., Cotter, P.D., Dinan, T.G. & Cryan, J.F. (2015) Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain, behavior, and immunity*). Daarom verwachten wij ook effect te zien van darmmicrobiota in muizen van 3 weken oud.
- DAP1, onderdeel B: De commissie vraagt om betere onderbouwing van de aantallen dieren per groep. Aan de hand van eerder uitgevoerde experimenten binnen onze onderzoeksgroep is vastgesteld dat 14 muizen per groep nodig is om verschillen aan te kunnen tonen voor de te onderzoeken parameters. Dit aantal is gebaseerd op poweranalyses gebaseerd op gegevens gevonden in literatuur en uit onze voorgaande studies. De commissie vraagt tevens waarom wij 8 experimenten willen doen. In deze dierproef worden twee componenten van ons onderzoeksvoorstel onderzocht. De eerste vraag die wij willen beantwoorden is of de darmmicrobiota effecten heeft op gedrag en cognitie. Om dit te onderzoeken moeten we één experiment uitvoeren. De darmmicrobiota is afkomstig van mensen die gediagnosticeerd zijn met ADHD. Wij hebben hiervoor mensen geselecteerd die extreme hyperactiviteit vertonen om grotere gedragsverschillen te genereren en te detecteren in onze proefopzet. De tweede vraag die wij willen onderzoeken is of specifieke bacteriën een effect hebben op cognitie en gedrag. Voor het beantwoorden van deze vraag moeten we in totaal 7 experimenten uitvoeren. Eerst willen we vier verschillende bacteriestammen onderzoeken, zoals *Lactobacillus* en *Bifidobacterium*, die worden vaak gebruikt als probiotica, (Gilbert, J.A.,



Krajmalnik-Brown, R., Porazinska, D.L., Weiss, S.J. & Knight, R. (2013) Toward effective probiotics for autism and other neurodevelopmental disorders. *Cell*, **155**, 1446-1448) en *Pseudomonas spp*, die vaak voorkomen in melk en melkproducten. Kiemvrige muizen zullen hiervoor worden gekoloniseerd met deze bacteriesoorten waarna gedrag en cognitie zullen worden onderzocht. Vervolgens zullen wij drie experimenten uitvoeren waarin we muizen met normale darmmicrobiota infecteren met de drie bacteriestammen die het meeste effect hebben op gedrag en cognitie.

- DAP 2, onderdeel B: De commissie vraagt om betere onderbouwing van de aantallen dieren per groep. Aan de hand van eerder uitgevoerde experimenten binnen onze onderzoeksgroep is vastgesteld dat 14 muizen per groep nodig is om verschillen aan te kunnen tonen voor de te onderzoeken parameters. Dit aantal is gebaseerd op poweranalyses gebaseerd op gegevens gevonden in literatuur en uit onze voorgaande studies. De dierexperimenten-commissie vraagt ook om nadere uitleg over onze keuze om maximaal 5 experimenten te willen doen. In deze dierproefbeschrijving willen wij de effecten van antibiotica op darmmicrobiota en breinontwikkeling onderzoeken. Wij hebben vijf klassen antibiotica geselecteerd op basis van literatuur die wij graag zouden willen onderzoeken. Om deze klassen antibiotica te testen moeten wij vijf experimenten uitvoeren. Deze selecteerde klassen worden veel voorgescreven aan jonge kinderen en daarom is het belangrijk om van deze vijf klassen de effecten te onderzoeken op darmmicrobiota en breinontwikkeling.

- DAP 2 en 3, onderdeel K: De dierexperimentencommissie stelt dat het cumulatieve ongerief niet blijkt uit de beschrijving van de verschillende handelingen. De onderzoekers hebben de beschrijving en de bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU nogmaals nagelezen en hebben hieruit geconcludeerd dat het cumulatieve ongerief van alle dieren licht is. Wij verwachten dat de behandeling met antibiotica hooguit licht ongerief veroorzaakt. Geen van de klassen antibiotica zal matig ongerief veroorzaken. Dit hebben wij aangepast in onze aanvraag. Wij verwachten dat de diëten, die wij willen onderzoeken, licht ongerief veroorzaken aangezien het geen restrictieve diëten zijn. Dit hebben wij aangepast in onze aanvraag.

- DAP 3, onderdeel A tweede vraag : Wij zijn niet duidelijk geweest over hoe vaak de dieren gedragstesten ondergaan en hebben dit aangepast in de dierproefbeschrijvingen. De muizen ondergaan gedragstesten maximaal eenmaal per week. Verder vragen de commissieleden zich af waarom wij de dieren zo lang behandelen aangezien in het eerste experiment al na 3 weken effect te zien is. De muizen die wij van plan zijn te gebruiken in dit experiment hebben een normale darmmicrobiota. Het kan lang duren, volgens de literatuur zo'n 1-2,5 maand, om deze microbiota te veranderen door middel van dieet. In het eerste experiment willen wij kiemvrige dieren gebruiken, daarin kan de microbiota bijna onmiddellijk veranderd worden door toediening van darmmicrobiota. Uit andere onderzoeken blijkt dat dieet ook op latere leeftijd nog effecten heeft op breinfunctie. Dus verwachten wij ook effecten te zien op breinontwikkeling van dieet op latere leeftijd. Dit is ook een doel van het experiment, het onderzoeken of een dieetinterventie op latere leeftijd nog de breinfunctie kan beïnvloeden. Wij starten de experimenten in muizen van drie weken oud, dit is voor het begin van de adolescentie (begint omstreeks 6-7 weken). In deze periode is het brein nog heel plastisch: er vindt een overproductie van axonen en synapsen plaats en een toename in dichtheid van connecties tussen de amygdala and prefrontale cortex (Casey, B.J., Getz, S. & Galvan, A.

(2008) The adolescent brain. *Developmental review* : DR, **28**, 62-77). Deze snelle groei gaat door tot de muizen ongeveer 3 maanden oud zijn. Volgens de Jackson Laboratory, een leverancier van muizen, zijn muizen volwassen tussen 3-6 maanden. In deze periode is het brein volgroeid, maar is nog beïnvloedbaar door verschillende factoren.

- DAP 3, onderdeel B: De commissie vraagt om betere onderbouwing van de aantallen dieren per groep. Aan de hand van eerder uitgevoerde experimenten binnen onze onderzoeksgroep is vastgesteld dat 14 muizen per groep nodig is om verschillen aan te kunnen tonen voor de te onderzoeken parameters. Dit aantal is gebaseerd op poweranalyses gebaseerd op gegevens gevonden in literatuur en uit onze voorgaande studies. De commissie vraagt ook of wij beter kunnen uitleggen waarom wij maximaal 4 experimenten willen uitvoeren. In deze dierproef willen wij graag onderzoeken wat het effect is van verschillende diëten op darmmicrobiota en breinontwikkeling. Wij hebben vier diëten geselecteerd op basis van literatuur. Deze geselecteerde diëten omvatten diëten met hoge concentraties verzadigde of onverzadigde vetten en calorierijke diëten. Met een maximum van vier experimenten kunnen wij de effecten van deze diëten onderzoeken.

- DAP4, onderdeel A eerste vraag: De commissie vraagt of wij verwachten dat een ontwikkelingsstoornis een reversibele afwijking is die genezen kan worden door middel van dieet. Onze verwachtingen hadden wij niet duidelijk opgeschreven. Wij verwachten deze ontwikkelingsstoornissen niet te kunnen genezen door middel van dieet, maar wij verwachten wel symptomen van ontwikkelingsstoornissen op deze manier te kunnen verminderen.

- DAP4, onderdeel A tweede vraag: De dierexperimentencommissie vindt de experimentele handelingen in dit experiment preciezer beschreven. Wij hebben de andere experimenten ook aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

#### 9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

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

1. Het project is:

uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.

- 2.** De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie, translationeel onderzoek, is slechts gedeeltelijk in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De DEC is van oordeel dat dit project voor een aanzienlijk deel betrekking heeft op fundamenteel onderzoek. Daarnaast wordt er verkennend onderzoek gedaan naar de mogelijkheden om de bevindingen te vertalen in concrete interventies. De DEC meent dat dit verschil van inzicht over de doelcategorie de ethische afweging die zij dient te maken niet beïnvloedt.
- 3.** De DEC onderschrijft het belang van het voorgenomen onderzoek, dat er op gericht is om de betrokkenheid van de bacteriën in de darm bij het ontstaan en verloop van (neuronale) ontwikkelingsstoornissen, zoals ADHD en Autisme Spectrum Stoornis (ASD), in kaart te brengen. De doelstelling is nader uitgewerkt in de volgende subdoelstellingen: ‘rol van de darmflora of specifieke bacteriën bij gedrag en cognitie’; ‘effect van een onbalans in de darmflora op het functioneren van de mitochondriën’; ‘effect van diëten en antimicrobiële behandelingen op gedrag en cognitie’; ‘ontwerpen van antimicrobiële behandelingen en diëten om de samenstelling van de darmflora te normaliseren en zo te komen tot een normaal functioneren van de mitochondriën en normale ontwikkeling van de hersenen’. De hypothese van dit onderzoek is dat de samenstelling van het microbioom in de darm het functioneren van de mitochondriën beïnvloedt en via die route bij zou kunnen dragen aan het ontstaan van ontwikkelingsstoornissen van de hersenen, zoals ADHD en ASD. Het onderzoek heeft in de ogen van de DEC weliswaar betrekking op een risicovolle hypothese, maar daarbij dient in aanmerking te worden genomen dat de voorgestelde dierproeven voor het overgrote deel van de dieren licht ongerief zullen veroorzaken. De te behalen onderzoeksresultaten zullen meer inzicht verschaffen in het veronderstelde effect van darmbacteriën op mitochondria en op cognitie en gedrag. Voorts zal het voorgestelde onderzoek meer inzicht verschaffen in het effect van dieet aanpassingen of antimicrobiële behandeling op darmflora, cognitie, gedrag, hersenstructuren en –functie en mitochondriële functie. Deze resultaten kunnen op termijn bijdragen aan de ontwikkeling van antimicrobiële- of dieetinterventies voor de doelgroep om via beter functionerende mitochondria de ernst van ontwikkelingsstoornissen te verminderen. Het aantrekkelijk hieraan is dat het om relatief eenvoudig te implementeren, weinig ingrijpende interventies gaat.
- De grote omvang van de maatschappelijke problematiek verbonden met ontwikkelingsstoornissen als ADHD en ASD, brengt de DEC tot het oordeel dat zowel het verwerven van inzicht in de factoren die bijdragen aan het ontstaan ervan, als het uitzicht op eenvoudig te implementeren interventies, een substantieel belang vertegenwoordigen.
- 4.** De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het langs verschillende wegen beïnvloeden van de samenstelling van het microbioom in de darmen van muizen zal inzicht verschaffen in de invloed van het microbioom op het functioneren van de mitochondriën en op de hersenontwikkeling. Ook zal inzicht verkregen worden in de mogelijkheden om via dieetmaatregelen en behandeling met antibiotica het microbioom zo te beïnvloeden dat de functie van de mitochondriën en de hersenontwikkeling worden genormaliseerd. In de aanpak zijn verschillende, goed gekozen

- go/no go momenten ingebouwd. Deze onderzoeksgroep heeft voldoende ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over het effect van darmflora op cognitie, op gedrag (aandacht, hyperactiviteit en impulsiviteit) en op hersenstructuren en –functie van muizen.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
  6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Tien procent van de dieren in dit onderzoek zal matig ongerief ondervinden. De overige dieren ondervinden licht ongerief. Bij de dieren die matig ongerief ondervinden is dat hoofdzakelijk het gevolg van het toedienen van antibiotica of humane darmflora via orale gavage en de directe gevolgen daarvan (tijdelijke diarree) voor het welzijn. Bij de dieren die licht ongerief ondergaan is dat hoofdzakelijk het gevolg van de toediening van antibiotica, een aangepast dieet en het uitvoeren van gedragstesten.
  7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Het effect van darmbacteriën op cognitie, gedrag en hersenstructuren en –functie is niet zonder proefdieren te onderzoeken. De onderzoekers kiezen voor de muis als modeldier omdat het gedragsrepertoire van dit dier voldoende uitgebreid is om verstoringen in gedrag te kunnen meten.
  8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. Metingen van mitochondriële functies waarvoor extra dieren nodig zijn, worden tot een minimum beperkt. De onderzoekers hebben go/no go momenten ingebouwd om onnodige dierproeven te voorkomen. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren, en is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 750 muizen.
  9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. De voorgestelde gedragsexperimenten veroorzaken slechts licht ongerief bij de dieren. De dieren ontwaken niet meer uit hun verdoving. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
  10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek kunnen belangrijke nieuwe inzichten worden verkregen in het effect van de samenstelling van de darmflora op het functioneren van de mitochondriën, de ontwikkeling van de hersenen en cognitie en gedrag. Ook wordt onderzocht of en hoe antimicrobiële behandelingen en dieetinterventies deze factoren beïnvloeden. Op termijn zou dit kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van antimicrobiële of dieetinterventies die de ernst van ontwikkelingsstoornissen zoals ADHD en ASD kunnen verminderen. De interventies waaraan men denkt zouden relatief eenvoudig

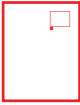
geïmplementeerd kunnen worden. De grote omvang van de maatschappelijke problematiek verbonden met ontwikkelingsstoornissen als ADHD en ASD, brengt de DEC tot het oordeel dat zowel het verwerven van inzicht in de factoren die bijdragen aan het ontstaan ervan, als het uitzicht op eenvoudig te implementeren interventies, een substantieel belang vertegenwoordigen.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat ongeveer 10% van de maximaal 750 muizen matig ongerief zal ondervinden, omdat, in een aantal gevallen via orale gavage, antibiotica en humane darmflora wordt toegediend. Dit kan tijdelijk tot ziekte en diarree leiden. De overige dieren ondervinden licht ongerief. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling zal worden gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het resterende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke, voor het merendeel licht 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
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Prof. [REDACTED]  
Postbus 9102  
6525 EZ NIJMEGEN  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015208  
**Bijlagen**

2

Datum 11-08-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 augustus 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015208. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

## Gegevens aanvrager

### Uw gegevens

Deelnemersnummer NWWA: 10300

Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KVK-nummer: 41055629

Straat en huisnummer:

Postbus: 9102

Postcode en plaats: 6525 EZ NIJMEGEN

IBAN: NL90ABNA0231209983

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer:

UMC St Radboud

### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████

Functie: ██████████

Afdeling: ██████████

Telefoonnummer: ██████████

E-mailadres: ██████████@██████████.██████████



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Instantie voor Dierenwelzijn  
Functie: [REDACTED]  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 8 september 2015  
Geplande einddatum: 8 september 2019

Titel project: Elucidating the link between environmental factors and mitochondrial dysfunction leading  
effecten van de darmmicrobiota op ontwikkelingsstoornissen

Titel niet-technische samenvatting: RU DEC  
Naam DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])  
Postadres DEC: [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

## Ondertekening

Naam:



Functie:

Instatie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum :

8 augustus 2015



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

F [REDACTED]

Postbus 9102

6525 EZ NIJMEGEN



**Centrale Commissie**

**Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD103002015208

**Bijlagen**

2

Datum 11-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

### Factuur

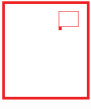
Factuurdatum: 11 augustus 2015

Vervaldatum: 10 september 2015

Factuurnummer: 201570208

| Omschrijving                                  | Bedrag   |
|---|----------|
| Betaling leges projectvergrunning dierproeven | € 741,00 |
| Betreft aanvraag AVD103002015208              |          |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
t.a.v. [REDACTED]  
Geert Groteplein-Noord 10  
6500HB Nijmegen

### 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  
AVD103002015208

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 17-08-2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven  
Geachte heer/mevrouw,

Op 08 augustus hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Effecten van de darmmicrobiota op ontwikkelingsstoornissen' met aanvraagnummer AVD103002015208. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### Welke informatie nog nodig

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

### Niet technische samenvatting

1. De niet technische samenvatting bij uw aanvraag geeft een ander aantal dieren (750) weer dan de bijlages dierproeven (768). Geeft het correcte aantal dieren op en corrigeer het aantal waar nodig.
2. U noemt in de bijlage dierproef knock-out dieren. Voor het fokken/houden en gebruiken van GGO dieren die niet uit een established line komen is een vergunning vereist. Ook voor het creëren van een lijn of houden van een lijn waarvan dieren ongerief hebben is een vergunning vereist. Daarom hebben wij hierover de volgende vragen:
  - a. Bent u van plan GGO dieren te gaan gebruiken, zo kunt u toelichten welke en waarom?
  - b. Gaat het daarbij om zogenaamde established lines of worden er lijnen gecreëerd?
  - c. Indien het gaat om nieuw gecreëerde lijnen, worden deze lijnen in de instelling gecreëerd of naar de instelling toegehaald?
  - d. Is er sprake van ongerief van deze dieren in de fok?
3. U gaat in experiment 1 oefenen op surplus muizen. Wat zijn de leerdoelen per training? Valt te verwachten dat voor de dieren van ander of meer ongerief sprake is, bijvoorbeeld het oefenen met oral gavages? Waarom

**Datum**  
17-08-2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015208

wordt dit geoefend? Gaat het om onderzoekers die de technieken nog niet beheersen? In dat geval moet ook de categorie hoger onderwijs en educatie worden toegevoegd in het projectvoorstel.

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

### **Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt. Als u de antwoorden op de vragen uiterlijk woensdag 19 augustus 2015 verstuurd, kan de CCD deze nog meenemen in haar vergadering van 28 augustus 2015.

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

19 AUG 2015



**Radboud universitair medisch centrum**  
Anatomie

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



[www.radboudumc.nl](http://www.radboudumc.nl)

Datum  
18 augustus 2015

Ons kenmerk

Pagina  
1 van 1

KvK 41055629/4

Onderwerp  
Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven. Aanvraagnummer:  
AVD103002015208

Datum  
18 augustus 2015

Ons kenmerk

Pagina  
1 van 3

█  
www.radboudumc.nl  
KvK 41055629/4

Onderwerp  
Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven. Aanvraagnummer:  
AVD103002015208

Wij willen de Centrale Diercommissie van harte danken voor de tijd die zij gestoken hebben in het lezen en beoordelen van deze aanvraag. Wij hebben de opmerkingen en vragen van de commissie getracht zo goed mogelijk te beantwoorden en te verwerken in het projectvoorstel en in de beschrijving van de dierproeven (zie bijlagen) en hopen dat het voorstel hiermee goedgekeurd kan worden.

## Projectvoorstel

### Vraag:

*De niet-technische samenvatting bij uw aanvraag geeft een ander aantal dieren (750) weer dan de bijlages dierproeven (768). Geef het correcte aantal dieren op en corrigeer het aantal waar nodig.*

### Antwoord:

U merkt op dat het opgegeven aantal muizen in de niet-technische samenvatting niet overeen komt met het gegeven aantal muizen in het projectvoorstel. Hartelijk dank voor uw opmerzaamheid. Wij hebben het aantal muizen in de niet-technische samenvatting aangepast.

### Vraag:

*U noemt in de bijlage dierproef knockout dieren. Voor het fokken/houden en gebruiken van GGO dieren die niet uit een established line komen is een vergunning vereist. Ook voor het creëren van een lijn of houden van een lijn waarvan dieren ongerief hebben is een vergunning vereist. Daarom hebben wij hierover de volgende vragen:*

- Bent u van plan GGO dieren te gaan gebruiken, zo kunt u toelichten welke en waarom?*
- Gaat het daarbij om zogenaamde established lines of worden er lijnen gecreëerd?*
- Indien het gaat om nieuw gecreëerde lijnen, worden deze lijnen in de instelling gecreëerd of naar de instelling toegehaald?*
- Is er sprake van ongerief van deze dieren in de fok?*

### Antwoord:

- a) Wij zijn van plan om in samenwerking met TNO Leiden ook de LDLr<sup>-/-</sup> muizen te gebruiken en hebben hiervoor een GGO vergunning (IG 04-002). Op een chow dieet ontwikkelen deze muizen geen obesitas. Maar wanneer zij gevoed worden met specifieke energierijke diëten ontwikkelen deze muizen obesitas. Obesitas tijdens zwangerschap is geassocieerd met mitochondriële dysfuncties in eicellen.<sup>1</sup> En daarom willen wij deze muizen gaan gebruiken om te onderzoeken wat effecten zijn van obesitas in een vroege levensfase op darmmicrobiota, mitochondriën en breinontwikkeling en of wij deze effecten kunnen verminderen met nutritionele interventie of antibiotica, aangezien deze behandelingen de darmmicrobiota, mitochondriën en breinontwikkeling mogelijk kunnen beïnvloeden.
- b) De LDLr<sup>-/-</sup> muis is een established line ontwikkeld als model voor metabole ziekten door TNO Leiden.
- c) Het gaat hier niet om een nieuw gecreëerde lijn en de dieren zullen vanuit TNO Leiden voor het experiment getransporteerd worden naar het Centrale Dierenlaboratorium (CDL) in Nijmegen. Zoals vermeld hebben wij een GGO vergunning hiervoor (IG 04-002).
- d) De LDLr<sup>-/-</sup> muis heeft geen extra ongerief, niet in de fok en niet bij supplementatie van (energierijke) diëten. Dit blijkt uit een eerder goedgekeurde dierexperimentele aanvraag (zie bijgevoegde Aanvraag onder 4: Aard van het ongerief, en ook Radonjic *et al.* (2013)<sup>2</sup>).

Vraag:

*U gaat in experiment 1 oefenen op surplus muizen. Wat zijn de leerdoelen per training? Valt te verwachten dat voor de dieren van ander of meer ongerief sprake is, bijvoorbeeld het oefenen met oral gavages? Waarom wordt dit geoefend? Gaat het om onderzoekers die de technieken nog niet beheersen? In dat geval moet ook de categorie hoger onderwijs en educatie worden toegevoegd in het projectvoorstel.*

Antwoord:

Het valt niet te verwachten dat het oefenen van technieken op de muizen voor meer ongerief zorgt. De onderzoekers hebben voldoende ervaring met de uit te voeren technieken. Maar tijdens deze experimenten gaan wij jonge dieren gebruiken. Hiervoor moet een aantal testen in de MRI set-up gedaan worden om te zien of optimale scans verworven kunnen worden of dat positie van bijvoorbeeld coil aangepast moet worden. Verder wordt voor MRI-testen algehele anesthesie toegepast waaruit de dieren niet zullen bijkomen. Hiervoor zullen wij isofluraan gebruiken. De juiste concentratie isofluraan moet worden aangepast aan het gewicht van de muizen. De dosis anesthesie is van invloed op de hersendoorbloeding en heeft mogelijk ook effect op mitochondriële functie. Door een aantal surplus muizen te gebruiken om de juiste set-up en isofluraanconcentraties vast te stellen, kunnen wij de optimale standaardcondities bepalen voor de neuroimaging. De onderzoekers hebben ervaring met het toedienen van microbiota via gavage. Maar de muizen die gavage ondergaan in deze experimenten worden gehuisvest in isolatoren. Met behulp

<sup>1</sup> Wu, L.L., Russell, D.L., Wong, S.L., Chen, M., Tsai, T.S., St John, J.C., Norman, R.J., Febrario, M.A., Carroll, J. & Robker, R.L. (2015) Mitochondrial dysfunction in oocytes of obese mothers: transmission to offspring and reversal by pharmacological endoplasmic reticulum stress inhibitors. *Development*, **142**, 681-691.

<sup>2</sup> Radonjic, M., Wielinga, P.Y., Wopereis, S., Kelder, T., Goelela, V.S., Verschuren, L., Toet, K., van Duyvenvoorde, W., van der Werff van der Vat, B., Stroeve, J.H., Cnubben, N., Kooistra, T., van Ommen, B. & Kleemann, R. (2013) Differential effects of drug interventions and dietary lifestyle in developing type 2 diabetes and complications: a systems biology analysis in LDLr<sup>-/-</sup> mice. *PLoS one*, **8**, e56122.



Datum  
18 augustus 2015

Ons kenmerk

Pagina  
3 van 3

van surplus muizen kunnen de onderzoekers hun vaardigheden, wat betreft gavage en gedragsobservaties optimaliseren voor uitvoering in isolatoren.

## Leges

### Vraag:

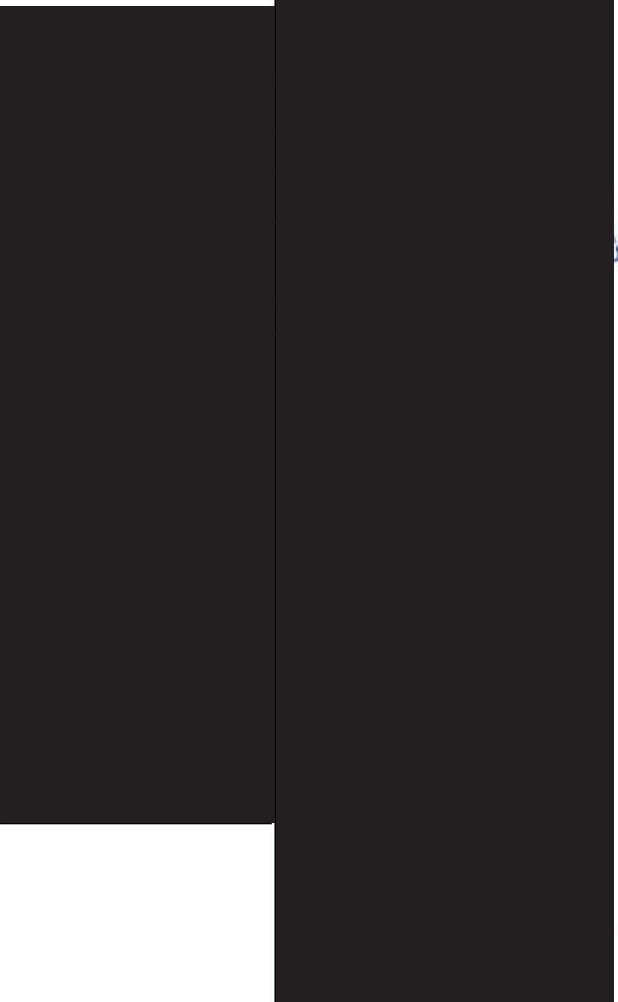
*De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.*

### Antwoord:

Wij hebben begrepen dat de leges die wij u verschuldigd zijn nog niet zijn ontvangen. Wij hebben hierover contact opgenomen met ons lokale DEC (RU-DEC) en hebben begrepen dat er een miscommunicatie was omtrent de factuur. Inmiddels hebben wij de gecorrigeerde factuur ontvangen en hebben wij de betaling in gang gezet. Wij hebben hierover contact gehad met [REDACTED] en hij heeft toestemming gegeven voor uitstel van betaling met een paar dagen.

Wij hopen dat deze beantwoording van vragen en de gecorrigeerde aanvraag opnieuw in behandeling genomen kan worden.

Met vriendelijke groet,



19 AUG 2015

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

## 1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager

6500 HB

Postcode

6500 HB

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*

Aanvraagnummer AVD103002015208

## 2 Bijlagen

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

- Aanvullende informatie
- Aanvraag eerder goedgekeurd voorstel
- Project proposal en description animal procedures

## 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

[Redacted]

Datum

10-08-2015

Handtekening

[Redacted]

## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal 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](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

## 1 General information

- |     |  |  |
|-----|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300  |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen   |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Elucidating the link between gut dysbiosis and mitochondrial dysfunction leading to neurodevelopmental disorders |

## 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research<br><input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research<br><input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production<br><input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier<br><input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures<br><input type="checkbox"/> 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.

Neurodevelopmental disorders are disabilities associated mainly with the functioning of the neurological system and brain. Individuals with these disorders can experience difficulties with language and speech, behaviour, learning, motor skills, and other neurological functions. Most neurodevelopmental disorders are caused by genetic abnormalities, including fragile-X syndrome and Down syndrome. Other neurodevelopmental disorders are referred to as complex because they have multiple and complex contributors rather than one clear cause. These complex disorders typically involve cognitive, behavioural or personality characteristics (Tager-Flusberg, 1999a). Complex neurodevelopmental disorders, such as attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and autism spectrum disorder (ASD), are common and affect both children and adults. Development of the nervous system is a complex process involving differentiation of neurons from neural stem cells. These differentiating neurons require high levels of energy, generated by mitochondria in the form of adenosine triphosphate (ATP). Mitochondria are localised in synapses, and synaptic function can be disturbed by mitochondrial morphology, function, and alterations in amount of mitochondria per cell (Kageyama and Wong-Riley 1982). Mitochondrial dysfunction contributes to several neurodevelopmental diseases (Anitha, Nakamura et al. 2013). Prevalence of several co-morbid features, like learning disabilities, motor delay, developmental regression, seizures and gastrointestinal (GI) dysfunctions, is typically higher in people with both a neurodevelopmental disorder and mitochondrial dysfunction (Rossignol and Frye 2012; Hsiao, McBride et al. 2013). Induced mitochondrial dysfunction in rats led to certain behavioural, metabolic and brain changes consistent with several neurodevelopmental disorders. These changes include repetitive behaviours, hyperactivity, increased amounts of reactive oxidative stress (ROS), reduced levels of antioxidants, and microglial activation (Rodríguez-capote et al. 2008).

GI dysfunction, such as chronic diarrhoea, constipation or intestinal infection, is a co-morbidity of special interest given its high prevalence and high correlation with symptom severity in several neurodevelopmental disorders (Adams, Johansen et al. 2011). The mechanisms leading to these GI problems remain unclear. One of the explanations of these GI dysfunctions found in people with neurodevelopmental disorders is dysbiosis, a significant change in gut bacterial composition. Gut bacteria contribute to neurodevelopment and function (Cryan and Dinan 2012) and there is a growing number of studies reporting dysbiosis in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders (Finegold, Downes et al. 2012; Gondalia, Palombo et al. 2012; Williams, Hornig et al. 2012; Kang, Park et al. 2013; Borre, O'Keeffe et al. 2014).

The adult human (and mouse) gut microbiota is dominated by the bacterial phyla Firmicutes and Bacteroidetes and seems to be stable and resilient against short-term changes (Faith, Guruge et al. 2013). The infant gut microbiota on the other hand is less stable and stabilises when the infant is 2-3 years old. The infant gut microbiota can be influenced by multiple factors, including antibiotics administered to the infant or mother, level of breastfeeding, mode of delivery, and genetics (Fallani, Amarri et al. 2011). Bergström et al. studied the gut microbiota of infants in a three-year Danish study with a cohort of 330 infants. Infants between 9 and 18 months old showed a significant shift in gut microbiota with the change from breastfeeding to solid foods (Bergstrom, Skov et al. 2014). Once established, the gut microbiota can be altered by antibiotic treatment, lifestyle, long-term change in diet, and bacterial infections (De La Cochetiere, Durand et al. 2005; Dethlefsen, Huse et al. 2008; Marques, Wall et al. 2015). We hypothesise a link between gut microbiota and neurodevelopmental disorders via mitochondria affecting behaviour and cognition. Bacteria can affect mitochondria in several ways, for example through short-chain fatty acids (SCFAs). SCFAs are also known to affect mitochondrial function (Belzacq, Haouzi et al. 2002, Hecker, Sommer et al. 2015), for example by inducing apoptosis in colonic epithelium cells. Some bacteria are able to modulate mitochondrial function in order to maintain their living environment by preventing host cell apoptosis or to promote bacterial spread by inducing apoptosis (Matarrese, Falzano et al. 2007; Stavru, Bouillaud et al. 2011). Distressed mitochondria generate signalling molecules such as mitokines. These mitokines exit the host cell and can bind to and regulate receptors present on all eukaryotic cells. Other bacterial species, for example *Pseudomonas* spp. are capable of disrupting mitochondrial surveillance in *Caenorhabditis elegans*. Mitochondria are responsible for the synthesis of haeme and iron-sulphur clusters. Mitochondria are an attractive target for bacteria because iron is essential for bacterial processes like DNA replication and metabolism. Therefore, bacteria developed several strategies, for example production of siderophores, to acquire iron from mitochondria. Disabling the mitochondrial surveillance pathway renders other virulence factors, anti-mitochondrial toxins or siderophores more effective (Liu, Samuel et al. 2014). *Pseudomonas* spp. are psychrotrophic bacteria, which thrive at low temperatures (0-4 degrees Celsius). These psychrotrophic bacteria are commonly found in dairy products. We hypothesise that people ingest these bacteria more often as people tend to keep dairy products in the refrigerator more often and for longer periods of time. Finally, bacteria can affect host health and neurodevelopment through short-chain fatty acids. These SCFAs (butyrate, acetate and propionate), produced mainly by gut bacteria, are absorbed by the intestinal epithelium. SCFAs are processed by the citric acid cycle in mitochondria and used in several processes. Butyrate is used by colonocytes as source of energy. Acetate and propionate are transported via the bloodstream to other tissues and organs. Acetate is used for the synthesis of long-chain fatty acids (Christ, 1968). Propionate can be used as substrate for gluconeogenesis, a process starting in the mitochondria. Oral administration of prionate to rats led to cognitive deficits, decreased social interactions, repetitive behaviour and abnormal motor activity (Shultz *et al.*, 2008). Thus, SCFAs are processed by mitochondria and fulfill several functions in the host. Dysbiosis can lead to altered levels of short-chain fatty acids (SCFA). A major cause of gut dysbiosis is treatment with antimicrobials. Various antibiotics are potential risk factors for neurodevelopmental disorders (Atladóttir, Henriksen et al. 2012; Desbonnet, Clarke et al. 2015; Rosenfeld 2015). In addition, several antibiotic classes administered, like fluoroquinolones or aminoglycosides, are associated with mitochondrial dysfunction as a result of the close similarities between mitochondria and the targeted bacteria. This is seen as a mild side-effect and is well tolerated by most treated individuals. However, this side-effect combined with the effect of antimicrobials on the gut microbiota could possibly influence neurodevelopment, and thereby cognition and behaviour in adult life. Another major cause of dysbiosis is diet, a key factor in determining gut microbial composition. Certain diets are able to impact cognition and behaviour to a great extent. Dietary therapies have been attempted to treat or ameliorate symptoms of a wide variety of neurological disorders, such as autism, epilepsy and Parkinson disease. In addition, dietary supplementation, for example omega-3 fatty acid or vitamin supplementation, is reported to have positive effects on symptoms of ADHD (Bos, Oranje et al. 2015; Rucklidge, Frampton et al. 2014). Obesity during pregnancy is

associated with mitochondrial dysfunction in the offspring (Wu, Russell et al. 2015) potentially leading to neurodevelopmental disorders. Childhood obesity is associated with poorer academic achievements and greater decay of brain structure and function. Obesity is also associated with reduced gut microbial diversity (Ley, Backh ed et al. 2005). Turnbaugh et al. demonstrate that these changes in diversity affect the metabolic potential of the microbiota. They show that the microbiota from obese individuals is more efficient in harvesting energy from diet compared to the microbiota from lean individuals. This efficiency in calorie harvest is transmissible from humans to mice by colonising germ-free mice with human microbiota from obese or lean individuals, indicating that dysbiosis contributes to obesity (Turnbaugh, Ley et al 2006). There is a growing body of research reporting significant effects of mitochondrial dysfunction on brain development and function. Studies reporting associations between dysbiosis and neurodevelopment are also numerous. However, most of these studies are correlational studies, studying the correlation rather than the causality. Dysbiosis affecting mitochondrial function potentially leading to neurodevelopmental disorders has not been studied to our knowledge.

### 3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to investigate the link between dysbiosis, mitochondrial dysfunction and developmental disorders. In order to study this link we have designed a research plan composed of multiple components. The first component of this project aims to investigate the contribution of gut microbiota or specific bacteria to behaviour and cognition. The second component of this project focusses on the link between gut dysbiosis and neurodevelopmental disorders. To study this we plan to study the effects of gut dysbiosis on mitochondrial function. With the third component of this project we intend to study effects of dietary or antimicrobial treatments on gut dysbiosis, cognition and behaviour. Finally, we plan to design antimicrobial or dietary interventions to normalise gut microbial composition resulting in healthy mitochondrial function and neurodevelopment.

Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with less distress to the mice. The central theme of our research group encompasses effects of diets on neuronal systems, emphasising cognitive disorders in relation with metabolism and cerebral circulation. Important tools available include neuroimaging, including MRS and DTI, histopathology, and behavioural test equipment.

The main objective should be achievable and realistic within the duration of the project because of the availability of knowledge, expertise and accommodation.

Important publications of our research group:

- [REDACTED]



---

### 3.3 Relevance

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

---

The prevalence of many complex neurodevelopmental disorders, like ADHD and autism spectrum disorder (ASD), has been increasing across recent decades. These disorders have a huge impact on the affected individual, family members and society. Co-occurring disorders are common, such as dyslexia, obsessive compulsive disorder, depression and eating disorders. Studies have reported ADHD symptoms in 30-50% of individuals diagnosed with ASD. Similarly, around 66% of persons with ADHD show features of ASD (Davis & Kollins, 2012). Progress in understanding these disorders has been slow and treatment options are limited. In this study we will investigate the link between dysbiosis and neurodevelopmental disorders.

We will study effects of certain diets and antibiotics, which are capable of causing gut dysbiosis, on brain development and function. Investigating interventions changing gut microbial compositions and thereby influencing behaviour and cognition will increase knowledge about developmental disorders and could potentially result in new therapeutic interventions to treat or ameliorate symptoms of neurodevelopmental disorders. In addition, we aim to elucidate the link between gut dysbiosis and neurodevelopmental disorders by studying the role of mitochondrial dysfunction in these disorders.

---

### 3.4 Research Strategy

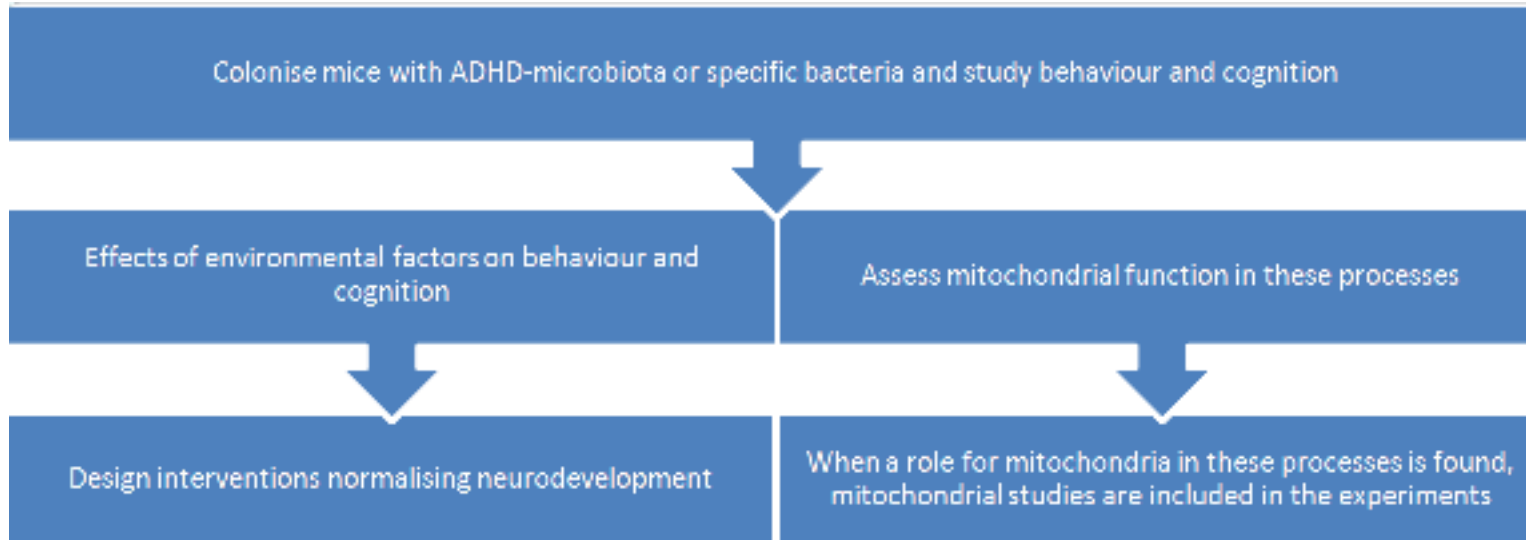
3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

---

Our main objective is to investigate the link between gut microbiota and neurodevelopment. In order to study this link we have designed several randomised experiments.

1. We aim to investigate the effects of dysbiosis on cognition and behaviour. We will do this by colonising mice with human microbiota from individuals with ADHD or by colonising mice with specific bacteria. After this we will study the impact of gut microbiota on behaviour and cognition.
2. We plan to study the link between gut dysbiosis, behaviour and function. Therefore, we will examine mitochondrial (dys)function after inducing dysbiosis.
3. We aim to study environmental factors that can lead to dysbiosis and study effects of dysbiosis on neurodevelopment.
4. We intend to design dietary and antimicrobial interventions to restore the gut microbiota to a healthy state, and thereby normalise neurodevelopment.

Overview of this project:



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. Gut microbiota from people with ADHD is different in composition compared to gut microbiota from persons without ADHD (personal communication and Pärtty et al., 2015). First, we plan to study effects of the microbiota on cognition and behavior. Most gut bacteria cannot be cultured which makes studying their causal role in disorders technically challenging. To investigate whether gut dysbiosis is a cause or consequence of neurodevelopmental disorders, we will colonise germ-free mice with human microbiota from individuals with ADHD. Any dysbiosis present in the donor microbiota will be transferred to the recipient. Germ-free mice exhibit characteristics reminiscent of several neurodevelopmental disorders, like abnormal stress response and increased motor activity. This altered behaviour can be reversed by introduction gut microbiota. (Diaz Heijtz et al., 2011; Sudo et al., 2004). Thus, using conventionally raised mice, mice with normal gut microbiota, has the advantage that these mice don't show abnormal behavioural patterns and brain function. However, these mice already possess gut microbiota. When we introduce human gut microbiota in these mice, the 'new bacteria' will compete with the 'old bacteria'. Therefore, we prefer to use germ-free mice to study effects of gut microbiota op neurodevelopment. To study effects of the microbiota on neurodevelopment, we will investigate behaviour and cognition. ADHD in humans is associated with inattentiveness, hyperactivity, and/or impulsivity (American Psychiatric Association 2013). Anxiety is a very common co-morbidity in several neurodevelopmental disorders including ADHD. We can measure these characteristics in mice with behavioural tests, like the marble burying test and the open field test. Behavioural tests will be conducted to study changes in behaviour caused by gut microbiota. ADHD is not only characterised by behavioural changes but also by structural and functional brain differences (Weyandt, Swentosky et al. 2013). To cognition we will use neuroimaging



techniques, such as Diffusion Tensor Imaging (DTI), rs fMRI and Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS), and histological and biochemical assays. After this we will compare microbial compositions from people with and without ADHD to identify suspect bacterial species for ADHD. In order to study behavioural and cognitive changes as result of specific bacteria we will colonise germ-free mice with specific bacterial species. These germ-free mice will be colonised only with these bacteria, enabling us to study behavioural and neuronal characteristics altered by these specific bacteria. After colonisation we want to examine cognition, behaviour and brain structure. When we see behavioural and/or cognitive changes as result of specific bacteria, we will infect conventionally raised mice with these bacterial species in order to mimic the natural situation.

2. Second, when we were able to induce dysbiosis by microbiota transplantation or by colonisation with specific bacteria, we plan to study the link between gut dysbiosis and neurodevelopment. To study this link we first have to induce gut dysbiosis. We will colonise mice with human ADHD-microbiota or with bacteria shown to be able to alter behaviour and cognition (first component). Inducing dysbiosis by diet or antibiotics is also possible, but inducing dysbiosis by colonising mice with microbiota or bacteria would be the best method as this will be almost instant, long-term, with only a few, mild side-effects. Changing gut microbial composition with diet takes a few months. Antibiotics directly affect mitochondria due to the striking similarities between bacteria and mitochondria, and has side-effects as well. After colonisation we will assess behaviour as well as mitochondrial function. We will also study effects of bacteria known to affect mitochondrial function, for example *Pseudomonas spp.* (Liu, Samuel et al. 2014; Manago, Becker-Flegler et al. 2015) on behaviour, cognition and mitochondrial function.

When no altered mitochondrial function is found we will not measure mitochondrial function in future experiments.

3. Third, we aim to investigate effects of environmental factors on gut microbiota and neurodevelopment. Hereby, we focus on two environmental factors: antibiotics and diet. These two factors are associated with dysbiosis, a significant change in microbial composition. In addition, we aim to study effects of certain diets on the composition of the gut microbiota. Certain long-term diets are able to change gut microbial composition and are capable of impacting cognition and behaviour to a great extent. We plan to expose mice to these environmental factors and consequently assess behaviour and cognition using various imaging, biochemical and physiological assays. The brain is an organ with high plasticity until the end of adolescence (around 3 months). In adulthood (3-6 months) the brain is fully grown, but remains plastic. We expect therefore, that we can still ameliorate symptoms of neurodevelopmental disorders later in life.
4. If we observed effects of environmental factors in component 3, we will design specific intervention studies aiming at re-establishing a healthy microbiota. This should normalise mitochondrial energy production resulting in healthy neurodevelopment. Although diet can cause mitochondrial dysfunction via dysbiosis, these very same environmental factors, chosen carefully, could also normalise gut microbiota and mitochondrial function promoting healthy neurodevelopment. To study this we plan to give **knock out mice a high fat diet. LDLr knockout**

mice develop obesity when fed a high fat diet. We plan to use this mouse model to investigate effects of childhood obesity on gut microbial composition, mitochondrial function and neurodevelopment. Upon observing effects we aim to ameliorate these effects with dietary or antimicrobial interventions. The exact nature of these interventions will depend on the answers to the three above mentioned components of this project.

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

All components of this project are focussed on the link between dysbiosis and neurodevelopmental disorders such as autism and ADHD. We will address the effects of several interventions, such as diet or antimicrobials, on gut microbiota, mitochondrial function, and cognition and behaviour. These experiments will require critical timing as interventions and colonisations need to take place before finalisation of neurodevelopment.

To study this we formulated the following milestones:

1. Gut microbiota has an impact on neurodevelopment and we can identify suspect bacterial species affecting cognition and behaviour.  
*If we observe affected neurodevelopment as result of the gut microbiota, we will explore the role of mitochondria in this process.*
2. Dysbiosis leads to mitochondrial dysfunction.  
*If we were able to demonstrate affected mitochondrial function in these processes, we will also assess mitochondrial function after dietary interventions. If we can show effects of gut microbiota and/or specific bacteria on behaviour and cognition, we will explore effects of diets or antibiotic treatment on gut microbial composition and neurodevelopment.*
3. Environmental factors, such as diet and/or antibiotics, lead to gut dysbiosis and consequently affect neurodevelopment.  
*When we observe effects of environmental factors on dysbiosis and on neurodevelopment, we will design dietary interventions to re-establish a healthy gut microbiota, leading to healthy neurodevelopment.*
4. Mitochondrial energy production and neurodevelopment can be normalised by dietary interventions.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

| Serial number | Type of animal procedure  |
|---------------|---|
| 1             | Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and behaviour |
| 2             | Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment         |
| 3             | Effects of diet on gut microbiota and neurodevelopment                |
| 4             | Interventions to re-establish a healthy gut microbiota                |

**Appendix**

**Description animal procedures**

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

**1 General information**

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and behaviour</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and behaviour |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |   |
| 1             | Effects of microbiota or specific bacteria on cognition and 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.

---

In order to study effects of the gut microbiota on neurodevelopment we plan to colonise mice with specific bacterial species or with human microbiota from individuals diagnosed with ADHD. After colonisation we aim to conduct behavioural tests followed by measuring mitochondrial function or performing neuroimaging tests. The general design for this experiment is as follows:

1. Colonisation

2. Behavioural tests

3. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure post mortem brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

All experiments, except neuroimaging and measuring mitochondrial function, will be performed in isolators wherein the mice are housed to prevent colonisation with environmental bacteria. As we house mice in isolators we are restricted in options for behavioural tests. This excludes all equipment requiring power. In addition, we cannot use equipment too large to fit inside the isolators (larger than 45x45cm).

We will colonise mice with microbiota or specific bacteria. We will collect stool samples once a week and sequence bacterial 16S rRNA genes. We will analyse stability of colonisation by comparing the taxonomic profiles of stool samples with the original sample.

Before and after colonisation we will conduct behavioural tests (at most once a week) in order to study behavioural changes after colonisation. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory.

After behavioural tests, mice are randomly divided into two groups: one group will be used for analysis of brain structure and function while the other group will be used to study post mortem brain mitochondrial function. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice. Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning by and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

Before we start with this project, we will practise techniques, such as gavage, neuroimaging, transcatheter perfusion, and measuring mitochondrial function, on surplus mice to optimise success rate of these experiments.

This experiment will take maximally 4 weeks. The aim of this experiment is to study effects of the gut microbiota on neurodevelopment. We will first colonise mice with human microbiota or with specific bacteria to study whether gut dysbiosis is a cause of neurodevelopmental disorders. Any dysbiosis present in the donor microbiota will be transferred to the recipient mouse. Most of the bacteria present in gut microbiota cannot be cultured, this makes studying their causal role in disorders technically challenging. After colonisation we will conduct behavioural tests and analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders.

This approach allows us to study effects of gut microbiota on neurodevelopmental disorders. First, we will colonise germ-free mice with human microbiota of specific bacteria. After that, we will study behaviour and cognition to investigate the causality between gut dysbiosis and neurodevelopmental disorders.

All mice will be colonised with a suspension of microbiota or specific bacteria in Phosphate Buffered Saline (PBS) via gavage. By oral force-feeding we can decrease variation as every mouse will receive exactly the same amount of microbiota. Administration of bacterial suspensions via gavage will have a mild, short-term impact on the animals. This procedure will be done once every week in order to reinforce the microbiota and will take about 5 seconds per mouse.

Behavioural tests can possibly cause mild, short-term distress. Tests conducted include the Open Field test, marble burying test, and object recognition test. These tests will be done at most once a week (before and after colonisation) in all mice and will take about 10 minutes each time. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

Brain function and structure, for example investigating cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity, will be examined in one group of mice. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcatheter perfusion-fixation using Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcatheter

perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis. Mitochondrial function will be measured in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

---

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed under comparable conditions. Introducing microbiota via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies.

We will first investigate if we are able to alter behaviour and cognition by microbiota transplantation or colonisation with bacteria. When we see behavioural and cognitive changes, we will include a group of mice to measure mitochondrial function. By practising challenging techniques on surplus animals, we will minimise the number of mice required for these experiments.

## **B. The animals**

---

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

---

We will use germ-free as well as conventionally raised mice (*Mus musculus*). Germ-free mice, mice without microbiota, are required for colonisation. These mice have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice (3 weeks old), after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala.

Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females. Before we start this project we will practise the required skills with surplus mice. These skills include gavage, MRI scanning and measuring mitochondrial function. The maximum number of animals we consider to be necessary to practise is 40 mice in total in this project.

We will use test groups (N=14), mice that receive human microbiota or specific bacteria, as well as control groups (N=14), mice receiving a sham treatment. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. The maximum number of animals we consider to be necessary is 224 mice, allowing us to conduct 8 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure as result of microbiota or specific bacterial species. With these 8 experiments we plan to do the following procedures:

- 1 experiment to investigate whether ADHD gut microbiota affects behaviour and cognition in germ-free mice
- 4 experiments to analyse effects of specific bacterial species on behaviour and cognition in germ-free mice followed by:
- 3 experiments to analyse effects of specific bacteria (selected in germ-free mice) species on behaviour and cognition in conventionally raised mice.

The specific bacterial species used will include *Pseudomonas* spp., often found in dairy products, and *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, often used in probiotics.

When behaviour and cognition are altered after colonisation, we will also include a group of mice to assess mitochondrial function (N=10).

Mitochondrial function will be assessed in mice colonised with the microbiota or bacteria shown to be most effective in changing behavioural and cognition. An additional 40 mice is required when mitochondrial function is proven to be affected by dysbiosis.

The total number of animals we consider necessary is 264 mice for this experiment and 40 mice to practise required skills.

| Species                      | Origin   | Maximum number of animals | Life stage |
|------------------------------|--|---------------------------|------------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 304                       | 3 weeks    |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

- **Replacement:**  
We plan to investigate effects of gut microbiota or specific bacterial species on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- **Reduction:**  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. We will only assess mitochondrial function when we were able to affect behaviour and cognition by colonisation. Mitochondrial function is studied only for microbiota or bacteria shown to be most effective in changing behaviour and cognition.
- **Refinement:**  
Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will either colonise mice with microbiota or introduce specific bacteria. Using one of these methods, introduced gut dysbiosis will be almost instant, long-term and with least side-effects. Inducing dysbiosis with diet will take three months and using antibiotics to promote gut dysbiosis will also introduce side effects. After inducing intestinal dysbiosis we will conduct behavioural tests to assess behavioural changes due to the dysbiosis. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable results. When we see behavioural changes in the animals we will assess cognition in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO<sub>2</sub> are known to affect mitochondrial function.

---

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

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.



## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

# Classification of discomfort/humane endpoints

## H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

---

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

Negative effects from colonisation with bacteria, mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the colonisation such as hyperactivity and increased anxiety. We know from experience that distress caused by these changes is mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Effects of the microbiota or bacteria on behaviour and cognition are described in literature. Some of the bacteria are known to occasionally cause diarrhoea in humans. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

Transplanting human microbiota to germ-free mice has been done before (Ridaura, Faith et al. 2013; Bruce-Keller, Salbaum et al. 2015) where the researchers studied the role of gut microbiota on obesity. No adverse effects, except a significant increase in weight, were reported. Our goal is to study effects of microbiota from individuals with ADHD on cognition and behaviour in mice. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 1%.

## **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the colonisation can be classified as mild to moderate. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'.

Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (80%) to moderate (20%)

## **End of experiment**

**L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed by cervical dislocation in order to study brain mitochondrial function and structure. The other group of mice will be sacrificed in order to study brain function and structure.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 2 | Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |   |
| 2             | Effects of antibiotics on gut microbiota and neurodevelopment   |   |               |                          |   |   |

## 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.

---

In order to investigate effects of antibiotics on dysbiosis, mitochondrial function and brain development, we will expose mice to these antibiotic-treatments. Some antimicrobial classes are associated with gut dysbiosis and mitochondrial dysfunction. We will use often described antibiotics which possibly affect mitochondrial function, such as fluoroquinolones and aminoglycosides. In order to study effects of environmental effects on gut microbial composition, we will collect stool samples once a week.

After treatment we aim to conduct behavioural tests followed by measuring mitochondrial function or performing neuroimaging tests. The general design for this experiment is as follows:

1. Treatment of conventionally raised mice with antibiotics

2. Behavioural tests

3. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure *ex vivo* brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

Before and after treatment with antibiotics we will conduct behavioural tests in order to study behavioural changes after colonisation. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory.

After behavioural tests, mice are randomly divided into two groups: one group will be used for analysis of brain structure and function while the other group will be used to study brain mitochondrial function. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice.

Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

This experiment will take maximally 5 weeks. The aim of this experiment is to study effects of antibiotics on gut dysbiosis and neurodevelopment. We will use conventionally raised mice, mice with normal gut microbiota. We will administer antibiotics via drinking water. We will select antibiotics known to affect mitochondrial function and often administered. To investigate effects of antimicrobials on neurodevelopment, we will conduct behavioural tests and analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders.

This approach allows us to study effects of antibiotics on neurodevelopmental disorders. We will administer antibiotics to mice with normal gut microbiota. After that, we will study behaviour and cognition to investigate whether antibiotic-treatments affect neurodevelopment.

All mice will be treated with antibiotics, such as fluoroquinolones, via drinking water. We will introduce these antimicrobial interventions to induce gut dysbiosis and after one month on antibiotic-treatment we will examine behaviour, brain structure, and brain function with behavioural studies and neuroimaging techniques. Every week (before and after treatment) stool samples will be collected to analyse microbial composition.

Behavioural tests, for example the Open Field test, the Marble Burying test, and the object recognition test, can possibly cause mild, short-term distress. These tests will be done at most once a week (before and after colonisation) in all mice and will take about 10 minutes each time. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

Brain function and structure, for example investigating cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity, will be examined in one group of mice. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcardial perfusion-fixation using 1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcardial perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis.

Mitochondrial function will be measured in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed in comparable conditions. Introducing microbiota via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. All experiments are performed by experienced researchers or technicians.

We will carefully select potential antibiotics in order to minimise the groups of mice needed for this experiment. Mitochondrial function will be measured only when we were able to show altered mitochondrial function in the previous experiment (animal procedure 1), or when we see behavioural and/or cognitive changes after antibiotic-treatment.

## B. The animals

---

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

---

We will use conventionally raised mice (*Mus musculus*). These conventionally raised mice, mice with normal microbiota, have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice, after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala. Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females.

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. We will use test groups ( $N=14$ ), mice that receive antibiotics associated with mitochondrial dysfunction, as well as control groups ( $N=14$ ). The maximum number of animals we consider to be necessary is 140 mice, allowing us to conduct 5 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure as result of treatment with antibiotics. With these 5 experiments we plan to study effects of five selected classes of antibiotics, including aminoglycosides, beta-lactam, chloramphenicol, fluoroquinolones and oxazolidinones. We start with three of these classes that are most often administered to young children or pregnant women. When we don't see effects of these three classes of antibiotics we will end this experiment.

When behaviour and cognition are altered after antibiotic-treatment, we will also use a group of mice to assess mitochondrial function ( $N=10$ ). Mitochondrial function will be assessed in mice treated with antibiotics shown to be most effective in changing behavioural and cognition. An additional 40 mice is required when behavioural and cognition are proven to be affected by dysbiosis. The total number of animals we consider necessary is 180 mice for this experiment.

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



|                              |  |     |         |
|------------------------------|--|-----|---------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 180 | 3 weeks |
|------------------------------|--|-----|---------|

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

- Replacement:  
We plan to investigate effects of gut dysbiosis on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- Reduction:  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. We will only assess mitochondrial function when we were able to affect behaviour and cognition by antibiotics or when mitochondrial function is shown to be affected in animal procedure 1. Mitochondrial

function is studied only for antibiotics shown to be most effective in changing behaviour and cognition.

- Refinement:

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will administer mice antibiotics associated with affected neurodevelopment. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable results. When we see behavioural changes in the animals we will assess cognition in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO<sub>2</sub> are known to affect mitochondrial function.

---

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

---

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane. Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

## F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

## G. Location where the animals procedures are performed

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

# Classification of discomfort/humane endpoints

## H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

---

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

---

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

Mild side-effects from antibiotic treatment, mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the antibiotics such as hyperactivity and increased anxiety. We know from experience that distress caused by these changes is mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

Antibacterials commonly cause some side-effects as antibiotics can destroy commensal bacteria living in the host. Our goal is to study effects of diet or usage of antibiotics on cognition and behaviour in mice. We expect to see behavioural and cognitive changes. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

Occurrence of side-effects from antibiotics cannot be prevented. These potential effects are considered to be mild with no significant impairment of the well-being or general condition. Humane endpoints are adopted to minimise severity. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

---

**J. Humane endpoints**

---

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

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 5%.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the antibiotics can be classified as mild. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'. Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (100%).

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

---

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed by cervical dislocation in order to study brain mitochondrial function and structure. The other group of mice will be sacrificed in order to study brain function and structure.

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

---

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>3                         | Type of animal procedure<br>Effects of diet on gut microbiota and neurodevelopment |

## 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.

---

In order to investigate effects of diet on dysbiosis, mitochondrial function and brain development, we will expose mice to these dietary interventions. Certain diets are able to impact cognition and behaviour to a great extent. Diets selected in this experiment are associated with neurodevelopment, for example high fat or high sugar diets. In addition, we will also study effect of diets considered healthy like diets high in omega-3 or carbohydrates. In order to study effects of diet on gut microbial composition, we will collect stool samples once a week.

After treatment we aim to conduct behavioural tests followed by measuring mitochondrial function or performing neuroimaging tests. The general design for this experiment is as follows:

1. Diet conventionally raised mice

2. Behavioural tests

3. Measuring mitochondrial function or conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure *ex vivo* brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

Before and after treatment with diets we will conduct behavioural tests in order to study behavioural changes after colonisation. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory.

After behavioural tests, mice are randomly divided into two groups: one group will be used for analysis of brain structure and function while the other group will be used to study brain mitochondrial function. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice.



Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

This experiment will take maximally 3 months. The aim of this experiment is to study effects of diet on gut dysbiosis and neurodevelopment. We will use conventionally raised mice, mice with normal gut microbiota. We will give mice diets associated with neurodevelopment, for example high fat or high sugar diets. To investigate effects of diet on neurodevelopment, we will conduct behavioural tests and analyse brain function and structure.

Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders.

This approach allows us to study effects of diet on neurodevelopmental disorders. We will give mice diet and after three months we will study behaviour and cognition to investigate whether diet affects neurodevelopment.

All mice will be fed special diets, for example high saturated fat and high caloric/sucrose diets or diets with unsaturated fatty acids. We will introduce these dietary interventions to induce gut dysbiosis and after three months on the diets we will examine behaviour, brain structure, and brain function with behavioural studies and neuroimaging techniques. Every week (before and after treatment) stool samples will be collected to analyse microbial composition.

Behavioural tests can possibly cause mild, short-term distress. Tests conducted include the Open Field test, marble burying test, and object recognition test. These tests will be done at most once a week (before and after colonisation) in all mice and will take about 10 minutes each time. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory.

Brain function and structure, for example investigating cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity, will be examined in one group of mice. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be sacrificed directly after these MRI experiments by transcardial perfusion-fixation using 1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcardial perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis. Mitochondrial function will be measured in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed in comparable conditions. Introducing microbiota

via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. All experiments are performed by experienced researchers or technicians.

We will carefully select potential diets in order to minimise the groups of mice required for this experiment. Mitochondrial function will be measured only when we were able to show altered mitochondrial function in the previous experiment (animal procedure 1), or when we see behavioural and/or cognitive changes after diets.

## B. The animals

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

We will use conventionally raised mice (*Mus musculus*). These conventionally raised mice, mice with normal microbiota, have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice, after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala. Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females.

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. We will use test groups ( $N = 14$ ), mice that receive diets associated with neurodevelopmental disorders, as well as control groups ( $N = 14$ ), mice given healthy diets. The maximum number of animals we consider to be necessary is 112 mice, allowing us to conduct 4 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure as result of diet. With these four experiments we plan to study effects of four selected diets, including diets with high saturated or unsaturated fatty acids and high calorie/sugar diets.

When behaviour and cognition are altered after diet, we will also use a group of mice to assess mitochondrial function ( $N = 10$ ). Mitochondrial function will be assessed in mice given diets shown to be most effective in changing behavioural and cognition. An additional 40 mice is required when behavioural and cognition are proven to be affected by dysbiosis. The total number of animals we consider necessary is 152 mice for this experiment.

| Species                      | Origin   | Maximum number of animals | Life stage |
|------------------------------|--|---------------------------|------------|
| Mice ( <i>Mus musculus</i> ) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 152                       | 3 weeks    |

## C. Re-use

---

**C. Re-use**

---

Will the animals be re-used?

---

No, continue with question D.

---

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

---

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

---

No

---

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

---

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

- Replacement:  
We plan to investigate effects of gut dysbiosis on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.
- Reduction:  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. We will only assess mitochondrial function when we were able to affect behaviour and cognition by diet or when mitochondrial function is shown to be affected in animal procedure 1. Mitochondrial function is studied only for antibiotics shown to be most effective in changing behaviour and cognition.
- Refinement:  
Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will give mice diets associated with affected neurodevelopment. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable

results. When we see behavioural changes in the animals we will assess cognition in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO2 are known to affect mitochondrial function.

---

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

---

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

## **F. Accommodation and care**

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

---

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

# **Classification of discomfort/humane endpoints**

## **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

---

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

Some diets can cause mild distress. Mostly gastrointestinal problems like diarrhoea, may be expected. Behavioural and cognitive changes caused by the induced dysbiosis such as hyperactivity and increased anxiety. We know from experience that distress caused by these changes is mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Feeding mice modified diets, that do not meet all of the nutritional needs are expected to cause mild distress. Our goal is to study effects of diet on cognition and behaviour in mice. We expect to see behavioural and cognitive changes. Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

We will prefer to use diets that do meet all of the animals' nutritional needs to prevent distress. Potential effects from diets are considered to be mild with no significant impairment of the well-being or general condition within the time-scale of this study. Humane endpoints are adopted to minimise severity. Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

### **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 1%.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

The discomfort caused by the diets can be classified as mild. Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'. Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (100%)

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

After finishing the experiment the mice will be sacrificed by cervical dislocation in order to study brain mitochondrial function and structure. The other group of mice will be sacrificed in order to study brain function and structure.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>4                         | Type of animal procedure<br>Interventions to re-establish a healthy gut microbiota |



## 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 carry out this experiment only when we see changes in behaviour and cognition after introducing antibiotics, diet (previous described animal procedures).

Obesity during pregnancy is associated with mitochondrial dysfunction in oocytes. Childhood obesity is associated with poorer academic achievements and greater decay of brain structure and function. Certain knock-out mice, for example the LDLr<sup>-/-</sup> mice, develop obesity after fed a high fat diet. We plan to use these knock-out mice to investigate effects of childhood obesity on gut microbial composition, mitochondrial function and brain function. The brain is an organ with high plasticity. Therefore we plan to design dietary intervention studies to re-establish a healthy gut microbiota, thereby normalising mitochondrial energy production resulting in healthy neurodevelopment. When we observe behavioural or cognitive effects of obesity we will aim to ameliorate these effects using dietary or antimicrobial interventions to re-establish a healthy gut microbiota, thereby normalising mitochondrial energy production resulting in healthy neurodevelopment. The exact nature of these interventions largely depends on outcomes of previous experiments. The general design for this experiment is as follows:

1. Introducing intestinal dysbiosis by high-fat diet
2. Behavioural tests
3. Treatment of gut dysbiosis either by diet, antibiotics or probiotics (animal procedure 3)
4. Behavioural tests
5. Measuring mitochondrial function and conducting neuroimaging techniques

Neurodevelopmental disorders are disabilities in which the development of the central nervous system is disturbed. Our primary outcome parameters are behaviour and cognition. These are characteristics typically affected in neurodevelopmental disorders. Behaviour and cognition will be assessed by behavioural tests, neuroimaging techniques, histology, and biochemical assays. We will measure *ex vivo* brain mitochondrial function to explore whether mitochondria play a role in neurodevelopment.

We will first feed LDLr<sup>-/-</sup> mice a high fat diet to induce obesity. After this, we will collect stool samples to analyse microbial composition and conduct behavioural tests to investigate effects of obesity on behaviour. We will measure behaviour like motor activity and anxiety using the Open Field test, a large square chamber. Typically, mice will spend a greater amount of time exploring the periphery of the Open Field test rather than the unprotected centre area. Mice that spend more time exploring the centre area show anxiety-like behaviour. The marble burying test is often used to assess characteristics of several neurodevelopmental disorders, including anxiety and obsessive-compulsive behaviour. Mice with a high degree of anxiety or repetitive behaviour tend to engage in a high degree of digging. Thus, the greater number of buried marbles is an indication of heightened anxiety-like or repetitive behaviour, often seen in people with neurodevelopmental disorders. The object recognition test is used to test recognition memory. During the first session, mice are presented two identical objects. After this session, one of the objects is replaced with a different object. The amount of time spent to explore the new object provides an index of recognition memory. When we see changes in behaviour,

we will treat these mice with dietary of microbial interventions. The exact nature of these interventions used will depend on the results of animal procedure 3. After dietary intervention, we will conduct behavioural tests to see if the diet is able to ameliorate changes in behaviour. We will focus on brain structure and function first. When we see changes in behaviour, brain structure, and brain function as result of one or more treatments, we will study mitochondrial function as well. Isoflurane, used to anaesthetise mice during neuroimaging to study brain function, is known to affect mitochondrial function. Therefore, it would be unreliable to measure mitochondrial function in isoflurane-treated mice. A separate group of mice is required to measure mitochondrial function. At the end of these experiments, we will correlate behaviour to brain structure and function, as well as correlate behaviour to mitochondrial function and structure. For this reason we want to test behaviour in all mice. Mice used for neuroimaging techniques are sacrificed directly after scanning and their brains will be used to examine brain structure using histological and biochemical assays.

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

---

This experiment will take maximally 4 months. The aim of this experiment is to design dietary interventions able to normalise gut microbial composition and neurodevelopment. To study possible interventions, we first have to induce dysbiosis. We will do this by first feed **LDLr<sup>-/-</sup> mice** a high fat diet to induce obesity and dysbiosis. After this we will conduct behavioural tests to study alterations in behaviour caused by dysbiosis. We then will give mice diets selected in animal procedure 3. We will again conduct behavioural tests to see if these diets are able to modify behaviour. Finally we will analyse brain function and structure. Behaviour and cognition are traits affected in persons with neurodevelopmental disorders. This approach allows us to study dietary or antimicrobial interventions to ameliorate traits of neurodevelopmental disorders. First, neurodevelopmental disorders are mimicked by inducing dysbiosis leading to altered behaviour and cognition. We then try to ameliorate these symptoms by giving mice high potential diets (selected in the third animal procedure). In order to design interventions to ameliorate effects of the gut dysbiosis on neurodevelopment and function we first aim to induce gut dysbiosis in **LDLr<sup>-/-</sup> mice**. After inducing dysbiosis, we will conduct behavioural tests (before and after inducing dysbiosis) which will take about 10 minutes each time. Behavioural tests can possibly cause mild, short-term distress. Tests conducted include the Open Field test, marble burying test, and object recognition test. These tests will be used to study behaviour, such as anxiety, attention, locomotor activity and self-grooming. ADHD is characterised by attention difficulties, impulsivity and hyperactivity. Hyperactivity and anxiety are often studied using the Open Field test. The Marble Burying test can be used to assess repetitive, compulsive-like behaviour, commonly seen in individuals diagnosed with neurodevelopmental disorders, such as autism and ADHD. The object recognition test can be used to assess recognition memory. When we see behavioural changes, we will treat mice with dietary interventions to ameliorate those symptoms using diets. The exact nature of the diet is dependent on outcomes of previous experiments (animal procedure 3). For example, we will give diets containing high saturated fat or unsaturated fatty acids, high caloric/sucrose, or diets containing probiotics. Mice will be fed diets ad libitum for approximately 3 months. During dietary intervention, we will conduct behavioural tests once a week to assess behavioural changes. We will use the same behavioural tests described above. Three months after starting on the diet, we will investigate brain function and structure in one group of mice. For this, we will examine cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity. Mice will be anaesthetised using 1.5% isoflurane via inhalation. During the MRI experiments heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. Analysis of brain structure and function will be done under general anaesthesia from which the animals do not recover consciousness. Mice will be

sacrificed directly after these MRI experiments by transcatheter perfusion-fixation using Phosphate Buffered Saline (PBS) while the mice are still under general anaesthesia. Transcatheter perfusion-fixation will be used as killing method to remove blood from the brain. After mice are sacrificed, brains will be used for histological and biochemical analysis.

Only when we have seen altered mitochondrial function as result of dysbiosis (animal procedure 1-3) we will examine mitochondrial function in this experiment. In order to study whether dietary interventions are able to normalise brain mitochondrial function, we will measure mitochondrial function in the other group of mice directly after sacrificing the mice by cervical dislocation. Mitochondrial function will be characterized post mortem in brain tissue by measuring functions such as respiration, complex I-IV activity, mitochondrial membrane potential and ATP/ADP levels.

---

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

---

Several considerations have been taken into account in order to minimise the number of animals. We will use littermate male mice of same weight. Mice are randomly placed in test or control groups. Both groups will be treated similarly and housed in comparable conditions. Introducing microbiota via gavage will also decrease variation. G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. All experiments are performed by experienced researchers or technicians.

Mitochondrial function will be measured only when mitochondrial function is proven to be affected by dysbiosis in previous experiments (animal procedure 1-3). Measuring mitochondrial function will only be performed in mice given the diet with the highest potential in affecting behaviour and cognition.

## **B. The animals**

---

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

---

We will use germ-free mice (*Mus musculus*). Germ-free mice, mice without microbiota, are required for colonisation. These mice have been widely used in studies investigating the effects of the gut microbiota on host brain function and development. Manipulations of the gut microbiota, such as antibiotic treatment, colonising germ-free mice and dietary interventions, are widely investigated and characterised in mice. Availability of germ-free and specific knock-out mice are indispensable because they allow manipulations that cannot be done in humans to study influences of the gut microbiota on brain structure and function. We plan to treat young mice, after weaning, before completion of the neurodevelopment. This is well before onset of adolescence (around 6-7 weeks). Before and during early puberty, an overproduction of axons and synapses occurs, followed by rapid pruning in later adolescence. Into early adulthood (at around 3 months), there is a continual growth in density of the fibers connecting the prefrontal cortex and the amygdala. Mice are subjected to a treatment for at least one month before neuroimaging tests will be performed. We intend to use male mice because many features of neurodevelopmental disorders, for example hyperactivity and repetitive behaviours, are more pronounced in males compared to females.

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). Effect sizes and anticipated standard deviations are based on prior comparable studies. The number of groups of mice used for this experiment depends on how many diets show potential in animal

procedure 4. We will start with the diets showing highest potential in affecting behaviour and cognition. We will use test groups (N=14), as well as control groups (N=14). The maximum number of animals we consider to be necessary is 112 mice, allowing us to conduct 4 experiments to analyse altered behaviour, brain function, and brain structure. When mitochondrial function is altered in previous experiments, we will also use a group of mice to assess mitochondrial function (N=10). Measuring mitochondrial function will only be performed in mice given the diet with the highest potential in affecting behaviour and cognition. An additional 20 mice is required when mitochondrial function is proven to be affected by dysbiosis. The total number of animals we consider necessary is 132 mice for this experiment.

| Species             | Origin   | Maximum number of animals | Life stage |
|---------------------|--|---------------------------|------------|
| Mice (Mus musculus) | B2. (In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen) | 132                       | 3 weeks    |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

- Replacement:

We plan to investigate effects of gut dysbiosis on behaviour, cognition and mitochondrial function. The pathways from gut to brain are complex and not yet fully understood. It is impossible to accurately mimic behaviour and cognition in vitro, thus replacing animals with in vitro experiments is not an option. As neurodevelopmental disorders are very complex, substituting mice with lower animals, such as

zebrafish, is not possible. Mitochondrial function will be measured ex vivo as well as analysis of brain structure. Substituting behavioural experiments by in vitro or ex vivo experiments is not possible.

- **Reduction:**  
We took several considerations into account to minimise variations between animals and thereby minimising the total number of required animals. We calculated minimum required numbers of mice using G\*Power. This experiment is only carried out when previous experiments (animal procedures 2 and 3) were successful. We will only assess diets that were proven to be able to affect behaviour and cognition in animal procedure 4. Diets with the highest potentials are investigated first. We will only measure mitochondrial function in these mice when we demonstrated altered mitochondrial function in previous experiments. For mitochondrial function, we will only assess the diet most affecting behaviour and cognition.
- **Refinement:**  
Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. We will conduct behavioural tests to assess behavioural changes due to the dysbiosis. The used behavioural tests give as little as possible distress and pain, while still yielding reliable results. When we see behavioural changes in the animals we will try to ameliorate these changes by treating the mice with dietary interventions. These interventions are chosen carefully in animal procedure 3. A group of control mice is given normal chow. Changes in behavioural are measured by the same behavioural tests used before the treatment. Finally cognition is assessed in both test and control mice using neuroimaging techniques to analyse brain physiology. Cerebral blood flow, connectivity structures, or grey and white matter integrity are commonly affected in individuals with neurodevelopmental disorders. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Humane endpoints are implemented to prevent further distress. Mitochondrial function will only be studied when proven to be able to affect behaviour and cognition in previous experiments. Mice are sacrificed by cervical dislocation because isoflurane and CO<sub>2</sub> are known to affect mitochondrial function.

---

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

Animals will be housed together with littermates in suitable cages with ad libitum access to food and water. Pain and distress during MRI experiments will be reduced by anaesthetising the mice by means of inhalation of 1.5% isoflurane (Protocol CDL, Nijmegen). Analgesia during experiments will not be necessary. To minimise pain and distress, humane endpoints are implemented. After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed. Expertise on the proposed experiments is available as well as adequate equipment and accommodation for the animals. This allows the procedures to be performed efficiently and with the least distress to the mice.

## Repetition and Duplication

### **E. Repetition**

---

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

---

## **Accommodation and care**

### **F. Accommodation and care**

---

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

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

## H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

Distress caused by behavioural changes are considered to be mild. During neuroimaging tests, mice are anaesthetised using 1.5% isoflurane. Effects of isoflurane include respiratory depression and a decrease in blood pressure. The level of anaesthesia can be adjusted rapidly. Mice used to assess mitochondrial function are sacrificed immediately by cervical dislocation. No other adverse effects on animal welfare will be expected

Explain why these effects may emerge.

---

Some behavioural tests, such as the Open Field test, can cause mild distress because mice are placed in an area unfamiliar to them. Anaesthetic-induced respiratory depression is not an uncommon effect of anaesthesia.

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

---

Distress caused by the expected behavioural and cognitive changes as result of obesity is considered mild. We will introduce animals to the behavioural tests before testing in order to lower stress levels. Heart rate and body temperature will be closely monitored and supported during isoflurane-treatment

## J. Humane endpoints

---

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

---

---

No > Continue with question K.

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

---

Debilitating diarrhea, rapid weight loss, dehydration. Bleeding from any orifice, edema, self-induced trauma, any condition interfering with daily activities (for example, eating or drinking), excessive or prolonged hypothermia or hyperthermia.  
After reaching the implemented humane endpoints, we will consult the veterinarian or animal welfare expert in order to determine whether the animals should be sacrificed.

---

Indicate the likely incidence.

---

The incidence of these humane endpoints is unlikely. Number of animals to suffer from debilitating diarrhoea is expected to be less than 1%.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

Levels of discomfort as result of behavioural tests are expected to be mild. Animals to be sacrificed to measure brain mitochondrial function are killed via cervical dislocation. Levels of discomfort are classified as non-recovery. Mice used to assess brain structure are anaesthetised and will not recover consciousness. This procedure is assigned to category 'non-recovery'.  
Cumulative levels of discomfort are expected to be mild (80%) to moderate (20%)

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---



After finishing the experiment the mice will be sacrificed in order to study brain function and structure, or brain mitochondrial function and structure.

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

---

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

---

Yes

---



## Centrale Commissie Dierproeven

10

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9102  
6525 EZ NIJMEGEN

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015208  
**Uw referentie**

Datum 28-8-2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte heer/mevrouw,

Op 04 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'effecten van de darm microbiota op ontwikkelingsstoornissen' met aanvraagnummer AVD103002015208. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag gedeeltelijk goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. Alleen proef 1 en 2 van het project kunnen vergund worden omdat er nog te veel onzekerheden zijn over proef 3 en 4. De uitkomsten van proef 1 en 2 zijn bepalend voor niet alleen de wetenschappelijke validiteit, maar ook de inrichting van proef 3 en 4.  
U kunt met uw project "effecten van de darm microbiota op ontwikkelingsstoornissen" starten. De vergunning wordt conform uw aanvraag afgegeven van 8 september 2015 tot en met 8 september 2019.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 07 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Over de wetenschappelijke validiteit en de inrichting van proeven 3 en 4 zijn nog te veel onzekerheden. Nut en noodzaak, alsmede de advies van de dierexperimentencommissie daarom deels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.  
Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Datum**  
28-08-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015208

### **Bezwaar**

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

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

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

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

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

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:

[Redacted signature area]

Ir. G. de Puffer

Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

**Naam:** Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

**Adres:** Postbus 9102

**Postcode en woonplaats:** 6525 EZ NIJMEGEN

**Deelnemersnummer:** 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 08 september 2015 tot en met 08 september 2019, voor het project 'effecten van de darm microbiota op ontwikkelingsstoornissen' met aanvraagnummer AVD103002015208, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC.

Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat er over proef 3 en 4 nog te veel onzekerheden bestaan. Niet alleen de wetenschappelijke validiteit maar ook de inrichting van proef 3 en 4 is afhankelijk van de uitkomst van proef 1 en 2.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]  
De aanvraag omvat de volgende beschelden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 04 augustus 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 04 augustus 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 04 augustus 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 04 augustus 2015
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 augustus 2015.

### Dierproeven

| Naam dierproef | Diersoort | Aantal dieren | Ernst                | Voorwaarden           |
|----------------|-----------|---------------|----------------------|-----------------------|
| Proef 1        | Muis      | 304           | 80% licht, 20% matig | Zie onder voorwaarden |
| Proef 2        | Muis      | 180           | 80% licht, 20% matig | Zie onder voorwaarden |

### Voorwaarden

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

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

**Datum**

28-08-2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015208

De CCD is verder van mening dat het doen van het geplande onderzoek in een speciale germ-free omgeving zeer moeilijk uitvoerbaar is vanwege de beperkte ruimte. Dit behoeft extra aandacht van de IVD. Daarom adviseert de CCD dat de experimenten op praktische uitvoerbaarheid getoetst worden door de IVD.

## Weergave wet- en regelgeving

### Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### Pijnbestrijding en verdooving

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

**Datum**  
28-08-2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015208

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

| Inventaris Wob-verzoek W16-04s |                              |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                              | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                     | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS 20151209</b>          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 1                              | Aanvraagformulier            |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                              | Brief mbt factuurinformatie  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 3                              | Projectvoorstel              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 4                              | Niet-technische samenvatting | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 5                              | Bijlagen dierproeven oud     |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 6                              | DEC-advies                   |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                              | Ontvangstbevestiging         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 8                              | Vraag en reactie 25-08-2015  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | Bijlagen dierproeven nieuw   |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                             | advies CCD                   |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 11                             | Beschikking en vergunning    |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |



1 1 AUG 2015



# Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*  
 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 [REDACTED]

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 Groteplein 10

Postbus 9101

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  Dhr.  Mw. [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Afdeling [REDACTED]

Telefoonnummer [REDACTED]

E-mailadres [REDACTED]

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

(Titel) Naam en voorletters  Dhr.  Mw. [REDACTED]

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

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 08 . 09 . 2015

Einddatum 08 . 09 . 2020

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Development of new tumor targeting agents for molecular imaging and therapy of cancer

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

Ontwikkeling van tracers om tumoren zichtbaar te maken en kanker gericht te behandelen

- 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

E-mailadres

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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



## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

|              |   |
|--------------|---|
| Naam         |   |
| Functie      | Instantie voor dierenwelzijn  |
| Plaats       | Nijmegen  |
| Datum        | 08 - 08 - 2015  |
| Handtekening |  |

Geert Grooteplein 10  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

**Radboud universitair medisch centrum**  
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen  
Huispost 628  
Geert Grooteplein 10



[www.radboudumc.nl](http://www.radboudumc.nl)

KvK 41055629/4


Datum Instantie voor Dierenwelzijn  
9 augustus 2015

Onderwerp  
Factuurinformatie Projectaanvraag

Geachte CCD,

Hierbij sturen wij u de administratieve gegevens behorend bij de ingediende projectaanvraag. Wij verzoeken u de factuur te versturen naar de IvD als gemachtigde van de vergunninghouder. Hiervoor AUB het bij u bekend e-mailadres gebruiken ([instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl](mailto:instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl)).

Om verwerking door de financiële afdeling mogelijk te maken verzoeken wij u tevens **op de factuur** de volgende gegevens te vermelden:

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>Factuuradres:</b>                 | Radboudumc<br>28 F&A crediteuren<br>Postbus 9101<br>6500HB, Nijmegen                |
| <b>Kostenplaats en kostensoort:</b>  | 040823-461220   |
| <b>CDL projectnummer:</b>            | 2015-0071   |
| <b>Verantwoordelijk onderzoeker:</b> |  |

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten



Instantie voor Dierenwelzijn  
[instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl](mailto:instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl)

### Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal 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](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

## 1 General information

- |     |  |   |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 10300   |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment.  | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  |
| 1.3 | Provide the title of the project.  | Development of new tumor targeting agents for molecular imaging and therapy of cancer |

## 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research<br><input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research<br><input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production<br><input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier<br><input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures<br><input type="checkbox"/> 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.

Cancer is the leading cause of death in the Netherlands. To improve patient survival, both advances in diagnosis and therapy are needed. Development of new molecular tracers may improve both diagnosis and cancer therapy, and will lead to better treatment outcome for cancer patients. Currently, new agents are being developed that specifically target tumor cells. These agents include monoclonal antibodies (e.g. cetuximab (anti-EGFR), bevacizumab (anti-VEGF), girentuximab (anti-CAIX), labetuzumab (anti-CEA)), antibody fragments (e.g. Fab'-fragments, nanobodies), peptides (e.g. RGD, Ac-TZ14011), and small molecules directed against specific tumor-associated targets, like the Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA). In order to characterize or visualize tumors, these tumor-targeting agents are labeled with for example a radioactive or fluorescent tag, which can be detected with a dedicated camera (e.g. PET, SPECT, fluorescence). Thus, these agents can be used to study biological processes in cancer, such as proliferation, metabolism, angiogenesis, and receptor expression, for tumor characterization and imaging to improve tumor detection, diagnosis, treatment, prediction of outcome, and treatment response monitoring.

Since the introduction of monoclonal antibodies(1) research has focused on both diagnostic and therapeutic potential of tagged antibodies. By targeting specific tumor-associated antigens, antibodies may show high and specific tumor accumulation, resulting in high tumor-to-nontumor uptake ratios. This enables the use of antibodies as tumor targeting vehicles carrying diagnostic or therapeutic agents.(2) Labeled antibodies have been used in (our) preclinical imaging research during the past 15 years, [e.g.(3-5)] which has resulted not only in increased knowledge about tumor biology, but has also led to the initiation of multiple clinical trials.[e.g.(6-8)]

Also, other tumor-targeting agents like peptides, nanobodies and small molecules have been a topic of extensive preclinical research.

s.

In addition to *imaging* of cancer, tumor-targeting tracers can also be used to *treat* cancer. For this purpose the agent is labeled with a cytotoxic drug or a high activity dose of an alpha, beta, or gamma emitters. Currently, antibody (fragments) and peptides are explored as vehicles to carry

cytotoxic loads to the tumor. For example, targeted radioimmunotherapy has been widely investigated in preclinical research by us and others, with Lu-177-labeled agents to treat prostate cancer (11), clear cell renal cell cancer (12), and colorectal cancer (6). In addition, the same agents used for therapy can be used for response monitoring and treatment adjustment, in a theranostic approach (13). This research is supported by several Dutch Cancer Society grants [REDACTED]

Initially, these tumor-targeting tracers are developed and tested extensively *in vitro*. The agents with optimal *in vitro* characteristics (stability, integrity, radiochemical purity, affinity, internalization kinetics, detectability, a.o) will be selected for *in vivo* testing to determine, optimize and exploit their *in vivo* tumor targeting properties. The *in vivo* behavior of the tumor-targeting agents (pharmacokinetics, biodistribution, accumulation in the tumor, therapeutic efficacy) can only be assessed in animal models. Knowledge obtained in these animal studies will be used to translate the application of the newly developed agents into clinic. Currently, most of our research is focused on prostate, kidney, head and neck, colorectal, ovarian, and breast cancer.

1. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
2. Fleuren ED, Versleijen-Jonkers YM, Heskamp S, van Herpen CM, Oyen WJ, van der Graaf WT, et al. Theranostic applications of antibodies in oncology. *Molecular oncology*. 2014;8(4):799-812.

3. [REDACTED]



---

### 3.2 Purpose

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

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

New and existing tumor-targeting agents will be (further) developed to improve tumor detection, characterization, and treatment of cancer. This may serve as valuable input to optimize and individualize cancer treatment. Therefore the aims of the project are:

- 1) In vivo characterization of new tumor-targeting agents for molecular imaging of cancer
- 2) In vivo characterization of new tumor-targeting agents for therapy of cancer

Experiments described in this project will answer the question whether the new agents are suitable to detect, characterize, image, and/or treat cancer in a preclinical setting. This type of research has proven very valuable for subsequent clinical translation of new imaging and/or therapeutic agents [e.g. (6-8)].

In the past decades, we have obtained broad experience with this strategy of development and preclinical *in vivo* characterization of tumor-targeting agents [e.g. (1-13)]. Our research is published in international peer-reviewed journals, and ample external funding has been obtained to conduct this research (e.g. Dutch Cancer Society, CTMM, NanoNext, ZonMW).

---

### 3.3 Relevance

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

---

In the experiments described in this project we will study biological molecular processes in tumors, like angiogenesis, receptor expression, tumor metabolism, proliferation, apoptosis, etc. The tumor-targeting tracers that we develop and characterize *in vivo* will further increase our knowledge on tumor biology. A similar research strategy characterizing and visualizing comparable tracers has led to more accurate clinical diagnostics and therapy. Newly developed tracers will improve this further. This may allow personalized medicine and patient-tailored therapy, to optimize the therapeutic effect and to minimize unwanted side effects and overtreatment for the individual patient. Finally, this may lead to improved treatment outcome and quality of life for cancer patients.

---

### 3.4 Research Strategy

---



---

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

---

The development, characterization and implementation of new tumor-targeting probes can be subdivided into four stages. Only stages 2 and 3 include animal experiments, but for an overview of the research strategy all four stages are briefly described below:

In the first stage, the newly developed tracers or drugs will be characterized by *in vitro* experiments, to determine their (bio)chemical properties (stability, integrity, radiochemical purity, detectability, lipophilicity, a.o.) and tumor-targeting potential (e.g. binding to tumor cells, affinity (Kon, Koff), cytotoxicity, internalization kinetics). This precedes the actual animal experiments. To minimize the number of animal experiments that need to be performed, only tracers that show optimal **in vitro** characteristics will be selected for *in vivo* testing.

In the second stage the *in vivo* pharmacokinetics and biodistribution of these agents will be studied in animal models (mice and rats). For this purpose, imaging (e.g. microPET, microSPECT, fluorescence) and/or biodistribution studies will be carried out to determine tumor targeting, tumor retention, clearance, and biodistribution of the tumor-targeting agents.

In the third stage, tumor targeting agents will be tested for their therapeutic efficacy, tolerability, and side effects (stage 3).

Diagnostic imaging and therapeutic agents that show promising *in vivo* behavior in our animal models are selected for translation into the clinic (stage 4).

---

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

---

The newly developed agents will be assessed *in vivo* for their imaging or therapeutic potential by studying their pharmacokinetics and tumor targeting properties. For this purpose, mice bearing subcutaneous or orthotopic human tumor xenografts will be used. In certain studies, also non-tumor bearing mice may be used. For example, when assessing only the blood clearance of a tumor-targeting agent, it is not necessary to induce a tumor. In a typical experiment, first, the tumor-targeting agent (e.g. labeled girentuximab in a model of renal cell carcinoma, or a labeled small molecule PSMA inhibitor in a model of prostate cancer) will be administered to the animal (typically intravenously). Then, experimental procedures like blood sampling, imaging, and/or biodistribution studies will be carried out to determine the pharmacokinetics and tumor targeting properties of the new agent.

The potential of new tumor targeting agents for cancer therapy can also be assessed in tumor or non-tumor bearing animals. Non-tumor bearing animals are frequently used in studies with toxicity as the primary endpoint, in order to prevent that tumor growth is limiting the duration of the follow up (e.g. renal toxicity may occur weeks to months after therapy). In a typical experiment, first, the therapeutic agent will be administered (either a single dose or multiple weekly i.p. injections) and the therapeutic effect and toxicity will be monitored longitudinally. Therapeutic efficacy may be assessed by measuring tumor size by caliper measurements or non-invasive imaging techniques. Toxicity may be assessed by measuring body weight and/or by analysis of hematological and specific organ toxicity in blood samples.

The majority of these studies will be carried out in immunodeficient mice, as these are the lowest vertebrates in which human cancer xenografts grow without being rejected. However, some experimental models are not available in mice (e.g. liver metastases of colorectal cancer), or can only

be mimicked in rats (e.g. hyperthermic intraperitoneal chemotherapy of peritoneal carcinomatosis). In these cases, rats will be used and the same procedures as described above will be applied.

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

After the development and in vitro characterization of tracer, the animal studies involve:

- 1) In vivo assessment of
  - a) tumor targeting
  - b) tracer accumulation
  - c) clearance
  - d) pharmacokinetics
- 2) Optimization of agents for imaging and/or therapy

After each step we will evaluate whether the tracer is suitable for imaging and/or therapy of cancer. If the tracer shows unfavorable in vivo behavior this will serve as a no go for further evaluation. In case the probe requires further optimization, new in vitro studies will be carried out (e.g. with respect to stability, affinity), followed by in vivo characterization (e.g. tumor targeting, accumulation, circulatory half-life), imaging and/or therapy studies.

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             | Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in mice |
| 2             | Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in mice    |
| 3             | Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in rats |
| 4             | Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in rats    |

**Appendix****Description animal procedures**

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

**1 General information**

|     |   |  |   |
|-----|---|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>1                         | Type of animal procedure<br>Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in mice |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The aim of the experiments is to determine the in vivo behaviour (e.g. tumor targeting, retention, clearance, etc) of new tumor targeting agents in animal models. For this purpose, the agent will be administered (e.g. i.v., i.p., etc) to the animal and subsequently the pharmacokinetics and biodistribution of the agent can be studied by means of biodistribution and/or imaging. In addition, the pharmacokinetics can be studied by for example blood sampling or urine collection.

A standard approach to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent includes the following experiment:

1. Dose optimization: determine which dose of the tumor targeting agent results in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue
2. Pharmacokinetics: Determine the pharmacokinetics of the tracer (e.g. how rapidly accumulates the tracer in the tumor and clears from normal tissue and circulation)
3. Imaging of the distribution of the tumor targeting agent in vivo

To quantitatively determine the in vivo behaviour of the tumor targeting agent we will use the following primary end points

- Tumor and normal tissue uptake measured by biodistribution study. In this set up the animal will be euthanized at a certain time point (e.g. 1h, 24h, 72h) after injection of the tumor targeting agent. The animals will be dissected and tumor and normal organs will be collected. The uptake in tissues of interest will be quantified by using for example a gamma counter. Aliquots of the injected tracer will be counted simultaneously.
- Tumor and normal tissue uptake measured by imaging. In this set up, the injection of the radiotracer will be followed by an imaging procedure (e.g. optical, SPECT or PET) under anesthesia. Since it is not necessary to euthanize the animal, this procedure can be repeated at several time points after injection. After the scan, a 3D image will be reconstructed and a region of interest will be drawn around the tumor and tissue of interest to quantitatively determine the activity concentration.
- Pharmacokinetics of a tracer will be determined by taking blood samples (e.g. via cheek puncture, tail cut) or urine samples. The tracer concentration can be measured by for example ELISA or by measuring the radioactive or fluorescent signal (e.g. in a gamma counter).

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed by our research group and by other international research groups. (1-5)

4. Tolmachev V, Varasteh Z, Honarvar H, Hosseinimehr SJ, Eriksson O, Jonasson P, et al. Imaging of platelet-derived growth factor receptor beta expression in glioblastoma xenografts using affibody molecule <sup>111</sup>In-DOTA-Z09591. J Nucl Med. 2014;55(2):294-300.

5. Luo H, Hong H, Slater MR, Graves SA, Shi S, Yang Y, et al. PET of c-Met in cancer with <sup>64</sup>Cu-labeled Hepatocyte Growth Factor. J Nucl Med. 2015.

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

---

In a standard experiment the first step is to inject or transplant the animals with a tumor. In case the tumor requires growth factors or hormones to grow, a growth factor pellet will be transplanted subcutaneously. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (on average this takes 2-3 weeks), the animal will be injected with the tumor targeting agent. After injection, blood samples can be collected to measure the pharmacokinetics of the tracer. Depending on how fast the tracer accumulates in the tumor and clears from the circulation, biodistribution and imaging studies will be performed at several time points (e.g. 1h, 24h, and 72h) after injection to quantitatively determine the biodistribution of the tracer. On average, these type of studies will take three weeks. However, in case of slow growing tumors or longitudinal studies, the total time an animal is in the experiment can be longer (maximum 6 months).

In more detail, the following experimental steps can be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under general anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less than a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.
- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplanation of the pellet will be performed in the same session.
- Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc.). The maximum number of injections of a tumor targeting agent is six. The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).

- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This can be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 15-20 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 100-150 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total. The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal (standard 1-2 per week, but if necessary the animals will be weighed daily). The duration is less than one minute.
- Measuring of tumor size using a caliper. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, and if necessary it will be measured daily. The duration is 2 minutes.
- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1 second to 3 hours. Most scans can be acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer 18F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection (the maximum number of times fasting will be used is five times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15-23

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

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies. For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

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

---

In most studies we will use immunodeficient athymic mice, because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, mice tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the B16 melanoma cell line derived from C57BL/6, will be performed in C57Bl/6 mice). The most frequently used animal strains are:  
Mice: BALB/c nude, BALB/c rj/nu, SCID, C57Bl/6, BALB/c and Swiss, C3H mice, FVB mice, CBA mice, NSG mice  
However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question.

For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 4,000 mice. This calculation is based on the following:

In order to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent, and to optimize it for imaging and therapy purposes, several experiments will be carried out.

- First, a dose-optimization study will be performed to determine which tracer dose will result in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue. In general we need six groups to optimize this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 30 animals per dose optimization study.

- Next, the pharmacokinetics will be studied by performing biodistribution studies at different time points. On average we will need eight groups of animals for this, which results in approximately 40 mice per pharmacokinetics study.

- In the third stage imaging will be performed. For this we will need approximately 10 animals.

Based on this, we estimate that we will need approximately 80 mice to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for imaging and therapy.

During the last three years, we have developed tumor targeting agents for several tumor associated antigens, eg [REDACTED]

For each target, different types of radiotracers can be designed, such as monoclonal antibodies or antibody fragments, nanobodies, affibody molecules, peptides, and small molecules. These agents differ in several aspects like affinity, size, tumor accumulation, clearance, etc. In addition, monomers, dimers, or heterodimers can be produced in order to increase the affinity and tumor targeting potential of these agents.

We expect to develop ten new radiotracers per year. In order to fully characterize and optimize these agents (dose optimization, pharmacokinetics, imaging) we will need 800 mice per year. In total this will result in 4,000 animals in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| mice    |        | 4000                      | 6-8 weeks  |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

---

**D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

**Replacement:**

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

**Reduction:**

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

**Refinement:**

The experiments will be carried out in mice and rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures themselves. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers.



4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. J Nucl Med. 2010;51(6):892-7.

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

---

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians.

In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted.

To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually.

If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.

For imaging and biodistribution, only a very low dose (tracer dose) of the tumor targeting agent is required. Therefore, we do not expect that this will cause discomfort or side effects.

Environmental effects:

During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Not applicable

## Accommodation and care

## **F. Accommodation and care**

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

# **Classification of discomfort/humane endpoints**

## **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

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

---

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

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress
- Discomfort due to tumor growth
- Injections or surgical procedures causing pain and stress
- Recovery from anesthesia
- Euthanasia

The tumor targeting agents themselves will not cause side effects or discomfort, since the injected dose is very low (tracer dose)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

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

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments start the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. In general, animals will be taken out of the experiment before tumors cause severe discomfort. However, in case tumors unexpectedly cause severe ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Based on extensive experiments with many different types of radiotracers, we do not expect that these tracers themselves will cause discomfort to the animals.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

---

### **J. Humane endpoints**

---

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

No > Continue with question K.

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

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size > 2 cm<sup>3</sup>
  - Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
  - Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
  - Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).
- 

Indicate the likely incidence.

---

In most imaging and biodistribution studies the experiments will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and thus it is very unlikely that the humane end points are reached. Based on previous experience we expect this to be less than 1%.

---

### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

We expect that 95% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 5% of the animals will experience mild discomfort, since we will not induce a tumor and perform imaging. In the exceptional situation that a tumor causes unexpected severe discomfort due to for example ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort. This will happen in less than 1% of the animals.

## **End of experiment**

---

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

---

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

At the end of the study we will determine the biodistribution of the agent ex vivo. In addition, tumors or normal tissue can be analyzed immunohistochemically.

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

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

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in mice</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 2 | Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in mice |
| Serial number | Type of animal procedure  |  |               |                          |   |  |
| 2             | Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in mice  |  |               |                          |   |  |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The aim of the experiments is to determine the therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in animal models for the treatment of cancer. Tumor targeting agents can be for example antibodies, peptides or small molecules. They can be used 'naked' or be labeled with beta- or alpha-emitting radionuclides (e.g. Lu-177, Y-90 or Bi-213) or cytotoxic drugs. In these experiments, the therapeutic efficacy of these agents will be compared with either the unlabeled compound or conventional anti-cancer treatment (e.g. chemotherapy, irradiation, surgical resection of the tumor, or cell-based therapies)

The primary outcome measurements of these experiments are:

#### 1) Toxicity

Toxicity will be assessed by measuring body weight and by analyzing blood and/or urine for hematological toxicity (hemoglobin, leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine). Body weight is a reliable indicator of the general health of the animal. In addition, chemotherapy or targeted radiotherapy can cause bonemarrow and kidney toxicity. This can be measured by analyzing blood samples for several hematological and renal parameters. Assessing the toxicity can not be performed in animal procedure 1, since in these studies only a tracer amount of the tumor targeting agent is administered, while the therapeutic dose is much higher (up to a 100 fold). (1-5)

#### 2) Tumor growth

Tumor growth can be measured by caliper measurements (in case of a subcutaneous tumor) or by non-invasive imaging techniques such as PET, SPECT or MRI (in case of an orthotopic tumor model such as prostate cancer, intraperitoneal tumors, liver metastases, etc). Both methods have shown to reliably monitor tumor growth. (1-5)

#### 3) Survival

Next to tumor growth, the survival is an important primary outcome measure to proof the therapeutic efficacy. Certain therapeutic agents may cause severe toxicity and therefore only measuring tumor growth is not sufficient. For example, tumor growth can be significantly inhibited during the first three weeks, but when the treatment causes severe hematological or renal toxicity, this may result in death of the animals. Thus, the overall effect of the treatment is not beneficial for the animal. In order to study survival, we will longitudinally monitor the animals until they die or have to be sacrificed based on the humane endpoint (e.g. tumor > 2 cm<sup>3</sup>, weight loss more than 25% compared to baseline, etc). (1-5)

#### 4) Assessment of molecular processes induced by treatment

Finally, the tumor targeting agent may induce molecular processes in the tumor that can be measured by non-invasive imaging or by analyzing the tumors by western blot or immunohistochemical stainings. An example of such a molecular process is a change in tumor cell proliferation that can be measured by 18F-FLT PET, or a change in glucose metabolism that can be measured with 18F-FDG PET. Changes in 18F-FLT or 18F-FDG often proceed the changes in tumor size as can be measured by caliper measurements and can therefore be used to predict response to treatment. (6, 7)

The experiments will be carried out in the following order:

The first step is to determine which dose results in optimal therapeutic efficacy without inducing severe toxicity (e.g. determination of the maximum tolerable dose (MTD)). The toxicity can be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to assess hematological (platelets,

leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine, urea). Next the therapeutic effect is monitored by measuring tumor growth and survival. Tumor growth can be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques (e.g. CT, MRI, PET, SPECT, optical, ultrasound). Finally, we can also study which molecular processes occur in tumors that were treated. Processes of interest are for example proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of growth factor receptor, activation of intracellular signaling pathways. These processes can be measured by non-invasive imaging techniques, or by collecting tumor samples for ex vivo analysis (immunohistochemistry, western blot, etc) at the end of the study.

[REDACTED]

[REDACTED]

7. Hong YS, Kim HO, Kim KP, Lee JL, Kim HJ, Lee SJ, et al. 3'-Deoxy-3'-18F-fluorothymidine PET for the early prediction of response to leucovorin, 5-fluorouracil, and oxaliplatin therapy in patients with metastatic colorectal cancer. J Nucl Med. 2013;54(8):1209-16.

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

In order to determine the therapeutic effect of tumor targeting agents, the following procedures can be carried out. The study will start with inoculation of a tumor. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (2-3 weeks) the therapy will be started. Tumor size will be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques. Toxicity will be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to analyze hematological and renal toxicity. Finally, the molecular processes in tumor (e.g. proliferation, apoptosis, etc) may be monitored by non-invasive imaging techniques, or by removing the tumor at the end of the study for ex vivo analysis (immunohistochemistry, westerblot, etc). The maximum time an animal is in an experiment is 12 months.

In more detail the following procedures will be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under generally anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same



time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less than a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.

- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplantation of the pellet will be performed in the same session
- Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The maximum number of injections is six. The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Administration of conventional anti-cancer therapy such as chemotherapy and antibody-based therapy (i.p., i.v., etc). Conventional anti-cancer therapy is generally injected intraperitoneally. However, certain agents can also be administered i.v., s.c., orally, etc. For example, small-molecule inhibitors like BRAF inhibitors require oral administration. Frequency: depends on the duration of the study. Therapy can be injected once, or in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Irradiation: Mice will undergo irradiation under general anesthesia (2 Gy - 10 Gy). Frequency: in general one dose of 10 Gy will be administered or radiation is administered fractionated (e.g. 3x3Gy). The duration of one irradiation session is approximately 10 minutes. Irradiation can be whole body (2 Gy) or only on the tumor (2 - 10 Gy).
- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This will be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 15-20 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 100-150 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total. The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal. However, standard bodyweight is measured 2-3 times a week, and if the general condition of the animal is getting worse the animals will be weighed daily. The duration is less than one minute.
- Measuring of tumor size. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, with a maximum of 7 times per week. The duration is 2 minutes.

- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1 second to 2 hours. Most scans are acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer 18F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection. (the maximum number of times fasting will be used is five times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15–23

---

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

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

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

---

In most studies we will use immunodeficient athymic mice, because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, mice tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the B16 melanoma cell line derived from C57BL/6, will be performed in C57Bl/6 mice). The most frequently used animal strains are:

Mice: BALB/c nude, BALB/c rj/nu, SCID, C57Bl/6, BALB/c and Swiss, C3H mice, FVB mice, CBA mice, NSG mice

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question.

For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 1,000 mice. This calculation is based on the following:

In order to study the therapeutic efficacy we will perform the following studies:

- First, a dose-finding study will be performed to determine at what dose level tumor growth can be inhibited without causing severe toxicity. In general we will need five groups to determine this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 25 animals per dose-finding study.

- Next, the effect of therapy on tumor growth, survival, and toxicity will be assessed. On average we will need five groups of animals for this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 10, which results in approximately 50 mice per study.

- In the third stage we can assess the effect of treatment on molecular processes in the tumor (e.g. proliferation, apoptosis, growth factor receptor expression, etc). For this we will need approximately five groups of animals. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 5, which results in approximately 25 mice per study.

Based on this, we estimate that we will need approximately 100 mice to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for cancer therapy.

During the last three years, we have developed several tumor targeting agents directed against tumor associated antigens like HER2, TROP-2, CEA, and CAIX. In addition, we are developing new tumor targeting agents directed against PSMA.

We expect to develop two new tumor targeting agents per year. In order to study the therapeutic efficacy and toxicity of these agents we will need 200 mice per jaar. In total this will result in 1,000 mice in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| mice    |        | 1000                      | 6-8 weeks  |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

Reduction:

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

Refinement:

The experiments will be carried out in mice and rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures itself. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[REDACTED]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. J Nucl Med. 2010;51(6):892-7.

[REDACTED]

---

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted.

To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually.  
If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.

Environmental effects:

During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (code 02)
- Discomfort due to tumor growth (code 03)
- Discomfort due to toxicity of treatment (code 03)
- Injections or surgical procedures causing pain and stress (code 03)
- Recovery from anesthesia (code 03)
- Euthanasia (code 02)

Explain why these effects may emerge.

---

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

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

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. However, in some studies, tumor size will be monitored longitudinally, for example when survival is studied. In this case, mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and in case the tumors causes severe discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

New tumor targeting agents can cause toxicity to the animal and this will be carefully monitored. The animals will be checked daily by the researcher or biotechnician and body weight will be measured up to 7 times a week. In case mice suffer from severe toxicity, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size of 2 cm<sup>3</sup>
- Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
- Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
- Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).

Treatment induced toxicity will cause changes in the humane endpoint as described above. Therefore, no treatment specific endpoints are described.

---

Indicate the likely incidence.

---

The most likely primary end point to be met in these studies is tumor size of 2 cm<sup>3</sup> or ulceration or invasive tumor growth that causes discomfort to the animal. However, in most cases experiments start when the tumors are approximately 0.1 cm<sup>3</sup> and it is unlikely that the tumor reach one of the humane endpoints. However, in some studies the mice will be followed for longer periods (e.g. to measure survival) and they may reach one of these end points. We expect that this will occur in 20% 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 ).

---

**We expect that 85% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 15% of the animals will experience severe discomfort and will reach the humane end point, for example in therapy experiments due to tumor growth up to 10% of the body weight (2 cm<sup>3</sup>)**

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---



**L. Method of killing**

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

At the end of the study we will collect tumor tissue to analyze molecular processes in the tumor.

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

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

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

|     |   |  |   |
|-----|---|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>3                         | Type of animal procedure<br>Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in rats |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The aim of the experiments is to determine the in vivo behaviour (e.g. tumor targeting, retention, clearance, etc) of new tumor targeting agents in animal models. For this purpose, the agent will be administered (e.g. i.v., i.p., etc) to the animal and subsequently the pharmacokinetics and biodistribution of the agent can be studied by means of biodistribution and/or imaging. In addition, the pharmacokinetics can be studied by for example blood sampling or urine collection.

A standard approach to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent includes the following experiment:

1. Dose optimization: determine which dose of the tumor targeting agent results in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue
2. Pharmacokinetics: Determine the pharmacokinetics of the tracer (e.g. how rapidly accumulates the tracer in the tumor and clears from normal tissue and circulation)
3. Imaging of the distribution of the tumor targeting agent in vivo

To quantitatively determine the in vivo behaviour of the tumor targeting agent we will use the following primary end points

- Tumor and normal tissue uptake measured by biodistribution study. In this set up the animal will be euthanized at a certain time point (e.g. 1h, 24h, 72h) after injection of the tumor targeting agent. The animals will be dissected and tumor and normal organs will be collected. The uptake in tissues of interest will be quantified by using for example a gamma counter. Aliquots of the injected tracer will be counted simultaneously.
- Tumor and normal tissue uptake measured by imaging. In this set up, the injection of the radiotracer will be followed by an imaging procedure (e.g. optical, SPECT or PET) under anesthesia. Since it is not necessary to euthanize the animal, this procedure can be repeated at several time points after injection. After the scan, a 3D image will be reconstructed and a region of interest will be drawn around the tumor and tissue of interest to quantitatively determine the activity concentration.
- Pharmacokinetics of a tracer will be determined by taking blood samples (e.g. via cheek puncture, tail cut) or urine samples. The tracer concentration can be measured by for example ELISA or by measuring the radioactive or fluorescent signal (e.g. in a gamma counter).

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed by our research group and by other international research groups. (1-5)

4. Tolmachev V, Varasteh Z, Honarvar H, Hosseinimehr SJ, Eriksson O, Jonasson P, et al. Imaging of platelet-derived growth factor receptor beta expression in glioblastoma xenografts using affibody molecule <sup>111</sup>In-DOTA-Z09591. J Nucl Med. 2014;55(2):294-300.

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

---

In a standard experiment the first step is to inject or transplant the animals with a tumor. In case the tumor requires growth factors or hormones to grow, a growth factor pellet will be transplanted subcutaneously. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (on average this takes 2-3 weeks), the animal will be injected with the tumor targeting agent. After injection, blood samples can be collected to measure the pharmacokinetics of the tracer. Depending on how fast the tracer accumulates in the tumor and clears from the circulation, biodistribution and imaging studies will be performed at several time points (e.g. 1h, 24h, and 72h) after injection to quantitatively determine the biodistribution of the tracer. On average, these type of studies will take three weeks. However, in case of slow growing tumors or longitudinal studies, the total time an animal is in the experiment can be longer (maximum 6 months).

In more detail, the following procedures can be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under general anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less than a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.
- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplantation of the pellet will be performed in the same session.
- Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. The maximum number of injections is six. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This can be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 20-30 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 200-250 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via

cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total. The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).

- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal (standard 1-2 per week, but if necessary the animals will be weighed daily). The duration is less than one minute.
- Measuring of tumor size using a caliper. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, and if necessary it will be measured daily. The duration is 2 minutes.
- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1 second to 3 hours. Most scans can be acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer <sup>18</sup>F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection (fasting will be performed with a maximum of 5 times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15–23

---

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

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

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

---

In general, new tumor targeting agents can be tested in mice. However, sometimes rat models are preferred over mice models because of their larger size. For example, we have developed a reliable rat model for colorectal cancer liver metastases, where the tumor cells are injected in the portal vein. This is a realistic metastatic colorectal cancer model, which is difficult to set up in mice because of the very small size of the portal vein. In most studies we will use immunodeficient animals because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, rat tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the CC531 colon carcinoma cell line derived from Wag/Rij, will be performed in Wag/Rij rats). The most frequently used animal strains are:

Rat: Wistar, Lewig, Wag/Rij, BN, Sprague Dawley

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question. For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 400 rats. This calculation is based on the following:

In order to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent, and to optimize it for imaging and therapy purposes, several experiments will be carried out.

- First, a dose-optimization study will be performed to determine which tracer dose will result in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue. In general we need six groups to optimize this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 30 animals per dose optimization study.

- Next, the pharmacokinetics will be studied by performing biodistribution studies at different time points. On average we will need eight groups of animals for this, which results in approximately 40 rats per pharmacokinetics study.

- In the third stage imaging will be performed. For this we will need approximately 10 animals.

Based on this, we estimate that we will need approximately 80 to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for imaging and therapy.

During the last three years, we have developed tumor targeting agents for several tumor associated antigens, eg: HER2, IGF-1R, EGFR, TROP-2, CEA, and CAIX. In addition, we are developing several new tumor targeting agents directed against for example immune-checkpoints, PSMA and Plexin D1.

For each target, different types of radiotracers can be designed, such as monoclonal antibodies or antibody fragments, nanobodies, affibody molecules, peptides, and small molecules. These agents differ in several aspects like affinity, size, tumor accumulation, clearance, etc. In addition, monomers, dimers, or heterodimers can be produced in order to increase the affinity and tumor targeting potential of these agents.

We expect to develop one new radiotracers per year that has to be tested in rats. In order to fully characterize and optimize these agents (dose optimization, pharmacokinetics, imaging) we will need 80 rats per year. In total this will result in 400 animals in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| rat     |        | 400                       | 6-8 weeks  |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

## D. Replacement, reduction, refinement

---

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

---

### Replacement:

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

### Reduction:

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

### Refinement:

The experiments will be carried out in rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. In general, new tumor targeting agents can be tested in mice. However, sometimes rat models are preferred over mice models because of their larger size. For example, we have developed a reliable rat model for colorectal cancer liver metastases, where the tumor cells are injected in the portal vein. This is a realistic metastatic colorectal cancer model, which is difficult to set up in mice because of the very small size of the portal vein.

Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures themselves. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warm mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. [REDACTED] shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. J Nucl Med. 2010;51(6):892-7.

[REDACTED]

[REDACTED]

---

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

---

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort. For imaging and biodistribution, only a very low dose (tracer dose) of the tumor targeting agent is required. Therefore, we do not expect that this will cause discomfort or side effects. Environmental effects:  
During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---



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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress
- Discomfort due to tumor growth
- Injections or surgical procedures causing pain and stress
- Recovery from anesthesia
- Euthanasia

The tumor targeting agents themselves will not cause side effects or discomfort, since the injected dose is very low (tracer dose)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

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

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments start the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment. The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. In general, animals will be taken out of the experiment before tumors cause severe discomfort. However, in case tumors unexpectedly cause severe ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Based on extensive experiments with many different types of radiotracers, we do not expect that these tracers themselves will cause discomfort to the animals.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size > 2 cm<sup>3</sup>
  - Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
  - Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
  - Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).
- 

Indicate the likely incidence.

---

In most imaging and biodistribution studies the experiments will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and thus it is very unlikely that the humane end points are reached. Based on previous experience we expect this to be less than 1%.

#### **K. Classification of severity of procedures**

---

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

---

We expect that 95% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 5% of the animals will experience mild discomfort, since we will not induce a tumor and perform imaging. In the exceptional situation that a tumor causes unexpected severe discomfort due to for example ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort. This will happen in less than 1% of the animals.

## **End of experiment**

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

At the end of the study we will determine the biodistribution of the agent ex vivo. In addition, tumors or normal tissue can be analyzed immunohistochemically.

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

---

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

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

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

## 1 General information

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>4                         | Type of animal procedure<br>Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in rats |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The aim of the experiments is to determine the therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in animal models for the treatment of cancer. Tumor targeting agents can be for example antibodies, peptides or small molecules. They can be used 'naked' or be labeled with beta- or alpha-emitting radionuclides (e.g. Lu-177, Y-90 or Bi-213) or cytotoxic drugs. In these experiments, the therapeutic efficacy of these agents will be compared with either the unlabeled compound or conventional anti-cancer treatment (e.g. chemotherapy, irradiation, surgical resection of the tumor, or cell-based therapies)

The primary outcome measurements of these experiments are:

#### 1) Toxicity

Toxicity will be assessed by measuring body weight and by analyzing blood and/or urine for hematological toxicity (hemoglobin, leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine). Body weight is a reliable indicator of the general health of the animal. In addition, chemotherapy or targeted radiotherapy can cause bonemarrow and kidney toxicity. This can be measured by analyzing blood samples for several hematological and renal parameters. Assessing the toxicity can not be performed in animal procedure 1, since in these studies only a tracer amount of the tumor targeting agent is administered, while the therapeutic dose is much higher (up to a 100 fold). (1-5)

#### 2) Tumor growth

Tumor growth can be measured by caliper measurements (in case of a subcutaneous tumor) or by non-invasive imaging techniques such as PET, SPECT or MRI (in case of an orthotopic tumor model such as prostate cancer, intraperitoneal tumors, liver metastases, etc). Both methods have shown to reliably monitor tumor growth. (1-5)

#### 3) Survival

Next to tumor growth, the survival is an important primary outcome measure to proof the therapeutic efficacy. Certain therapeutic agents may cause severe toxicity and therefore only measuring tumor growth is not sufficient. For example, tumor growth can be significantly inhibited during the first three weeks, but when the treatment causes severe hematological or renal toxicity, this may result in death of the animals. Thus, the overall effect of the treatment is not beneficial for the animal. In order to study survival, we will longitudinally monitor the animals until they die or have to be sacrificed based on the humane endpoint (e.g. tumor > 2 cm<sup>3</sup>, weight loss more than 25% compared to baseline, etc). (1-5)

#### 4) Assessment of molecular processes induced by treatment

Finally, the tumor targeting agent may induce molecular processes in the tumor that can be measured by non-invasive imaging or by analyzing the tumors by western blot or immunohistochemical stainings. An example of such a molecular process is a change in tumor cell proliferation that can be measured by 18F-FLT PET, or a change in glucose metabolism that can be measured with 18F-FDG PET. Changes in 18F-FLT or 18F-FDG often proceed the changes in tumor size as can be measured by caliper measurements and can therefore be used to predict response to treatment. (6, 7)

The experiments will be carried out in the following order:

The first step is to determine which dose results in optimal therapeutic efficacy without inducing severe toxicity (e.g. determination of the maximum tolerable dose (MTD)). The toxicity can be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to assess hematological (platelets, leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine, urea). Next the therapeutic effect is monitored by measuring tumor growth and survival.

Tumor growth can be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques (e.g. CT, MRI, PET, SPECT, optical, ultrasound). Finally, we can also study which molecular processes occur in tumors that were treated. Processes of interest are for example proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of growth factor receptor, activation of intracellular signaling pathways. These processes can be measured by non-invasive imaging techniques, or by collecting tumor samples for ex vivo analysis (immunohistochemistry, western blot, etc) at the end of the study.

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

In order to determine the therapeutic effect of tumor targeting agents, the following procedures can be carried out. The study will start with inoculation of a tumor. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (2-3 weeks) the therapy will be started. Tumor size will be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques. Toxicity will be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to analyze hematological and renal toxicity. Finally, the molecular processes in tumor (e.g. proliferation, apoptosis, etc) may be monitored by non-invasive imaging techniques, or by removing the tumor at the end of the study for ex vivo analysis (immunohistochemistry, westerblot, etc). The maximum time an animal is in the experiment is 12 months.

In more detail the following procedures will be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under generally anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less then a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.

- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplanation of the pellet will be performed in the same session - Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The maximum number of injections is six. The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Administration of conventional anti-cancer therapy such as chemotherapy and antibody-based therapy (i.p., i.v., etc). Conventional anti-cancer therapy is generally injected intraperitoneally. However, certain agents can also be administered i.v., s.c., orally, etc. For example, small-molecule inhibitors like BRAF inhibitors require oral administration. Frequency: depends on the duration of the study. Therapy can be injected once, or in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection).The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Irradiation: Mice will undergo irradiation under general anesthesia (2 Gy - 10 Gy). Frequency: in general one dose of 10 Gy will be administered or radiation is administered fractionated (e.g. 3x3Gy). The duration of one irradiation session is approximately 10 minutes. Irradiation can be whole body (2 Gy) or only on the tumor (2 - 10 Gy).
- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This will be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 20-30 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 200-250 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total.The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal. However, standard bodyweight is measured 2-3 times a week, and if the general condition of the animal is getting worse the animals will be weighed daily. The duration is less then one minute.
- Measuring of tumor size. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, with a maximum of 7 times per week. The duration is 2 minutes.
- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1



second to 2 hours. Most scans are acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer 18F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection. (the maximum number of times fasting will be used is five times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15-23

---

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

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

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

---

In general, new tumor targeting agents can be tested in mice. However, sometimes rat models are preferred over mice models because of their larger size. For example, we have developed a reliable rat model for colorectal cancer liver metastases, where the tumor cells are injected in the portal vein. This is a realistic metastatic colorectal cancer model, which is difficult to set up in mice because of the very small size of the portal vein. In most studies we will use immunodeficient rats, because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, rat tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the CC531 colon carcinoma cell line derived from Wag/Rij, will be performed in Wag/Rij rats). The most frequently used animal strains are:

Rats: Wistar, Lewis, Wag/Rij, BN, Sprague Dewley

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question.

For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Based on animal experiments that were performed [REDACTED] research group in 2012-2014 [REDACTED]. This calculation is based on the following:

In order to study the therapeutic efficacy we will perform the following studies:

- First, a dose-finding study will be performed to determine at what dose level tumor growth can be inhibited without causing severe toxicity. In general we will need five groups to determine this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 25 animals per dose-finding study.

- Next, the effect of therapy on tumor growth, survival, and toxicity will be assessed. On average we will need five groups of animals for this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 10, which results in approximately 50 mice per study.

- In the third stage we can assess the effect of treatment on molecular processes in the tumor (e.g. proliferation, apoptosis, growth factor receptor expression, etc). For this we will need approximately five groups of animals. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 5, which results in approximately 25 rats per study.

Based on this, we estimate that we will need approximately 100 rats to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for cancer therapy.

During the last three years, we have developed several tumor targeting agents directed against tumor associated antigens like HER2, TROP-2, CEA, and CAIX. In addition, we are developing new tumor targeting agents directed against PSMA.

We expect to develop one new tumor targeting agents for therapy per year. In order to study the therapeutic efficacy and toxicity of these agents we will need 100 rats per jaar. In total this will result in 500 rats in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| Rat     |        | 500                       | 6-8 weeks  |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

Reduction:

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

Refinement:

The experiments will be carried out in mice and rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures themselves. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warm mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. [REDACTED] others has shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[REDACTED]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. J Nucl Med. 2010;51(6):892-7.

[REDACTED]

---

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually.

If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.

Environmental effects:

During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

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

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

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

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

---

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

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

---

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

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (code 02)
- Discomfort due to tumor growth (code 03)
- Discomfort due to toxicity of treatment (code 03)
- Injections or surgical procedures causing pain and stress (code 03)
- Recovery from anesthesia (code 03)
- Euthanasia (code 02)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

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

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. However, in some studies, tumor size will be monitored longitudinally, for example when survival is studied. In this case, mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and in case the tumors causes severe discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

New tumor targeting agents can cause toxicity to the animal and this will be carefully monitored. The animals will be checked daily by the researcher or biotechnician and body weight will be measured up to 7 times a week. In case mice suffer from severe toxicity, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size of 2 cm<sup>3</sup>
- Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
- Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
- Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).

Treatment induced toxicity will cause changes in the humane endpoint as described above. Therefore, no treatment specific endpoints are described.

---

Indicate the likely incidence.

---

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. However, in some studies, tumor size will be monitored longitudinally, for example when survival is studied. In this case, mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and in case the tumors causes severe discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

New tumor targeting agents can cause toxicity to the animal and this will be carefully monitored. The animals will be checked daily by the researcher or biotechnician and body weight will be measured up to 7 times a week. In case mice suffer from severe toxicity, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

---

#### **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 ).

---

**We expect that 85% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 15% of the animals will experience severe discomfort and will reach the humane end point, for example in therapy experiments due to tumor growth up to 10% of the body weight (2 cm<sup>3</sup>)**

## **End of experiment**

---

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

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

**L. Method of killing**

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

At the end of the study we will collect tumor tissue to analyze molecular processes in the tumor.

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

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

Yes



## DEC-advies

---

### A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0071
2. Titel van het project: "Development of new tumor targeting agents for molecular imaging and therapy of cancer".
3. Titel van de NTS: "Ontwikkeling van tracers om tumoren zichtbaar te maken en kanker gericht te behandelen".
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: 0 [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 23-04-2015
  - in vergadering besproken: 12-05-2015
  - schriftelijke vragen gesteld: 18-05-2015
  - antwoorden en aangepaste aanvraag ontvangen op 19-05-2015
  - schriftelijke vraag gesteld: 21-05-2015
  - antwoord en aangepaste aanvraag ontvangen op 24-05-2015
  - anderszins behandeld: aangepaste aanvraag en finaal advies zijn op 27 juli 2015 in een schriftelijke e-mailronde voorgelegd aan de DEC-leden voor instemming.
  - termijnonderbreking(en) van 18-05-2015 tot 19-05-2015 en van 21-05-2015 tot 24-05-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
  - advies aan CCD: 07-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 18-05-2015
  - Strekking van de vragen:
  - 
  - **Project Proposal:**
  - - 3.1 Aan het eind van de tweede alinea is het woord 'Other' blijven staan.

- - 3.4.1. In de laatste zin van de alinea die de eerste fase beschrijft wordt in vitro bedoeld terwijl er in vivo staat.
  - **Description of Animal Procedures:**
  - - DAP2 en DAP4, onderdeel K: Het cumulatief ongerief voor de meeste dieren is matig. In welk percentage van de 1000 muizen of 500 ratten verwachten de onderzoekers ernstig ongerief?
  - Datum antwoord: 19-05-2015
  - Strekking van de antwoorden:
  - 
  - Project Proposal:
  - - 3.1 Het woord 'Other' is verwijderd.
  - - 3.4.1 In deze zin is 'in vivo' vervangen door 'in vitro'.
  - Description of Animal Procedures:
  - - DAP2 en DAP4, onderdeel K: Onderdeel K is als volgt aangepast: We expect that 85% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 15% of the animals will reach the humane end point, for example in therapy experiments due to tumor growth up to 10% of the body weight (2 cm<sup>3</sup>).
  - Datum: 21-05-2015
  - Strekking van de vraag: Verzoek om punt 3.5 van NTS te controleren op juistheid
  - Antwoord en aanpassing op 24-05-2015
  - De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

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

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'In vivo karakterisering van nieuwe tumor-specifieke tracers voor diagnostiek en therapie van kanker'. De te behalen onderzoeksresultaten zullen er toe leiden dat nieuwe tracers voor de kliniek beschikbaar komen welke tumoren specifiek aan kunnen tonen en bestrijden. De fundamentele kennis over tumorbiologie zal worden vergroot. Dit onderzoeksveld, waarbij ook het niet-invasief volgen van het succes van therapie een belangrijk onderdeel vormt, is sterk in opkomst en staat mondiaal zeer in de belangstelling. De resultaten kunnen op termijn derhalve leiden tot betere detectie, karakterisering en behandeling van kanker bij mensen. Gezien de ernst en de wijdverbreidheid van de aandoeningen waar het hier om gaat en gezien de grote behoefte aan effectieve en individueel gerichte behandelingen acht de DEC het belang van de doelstelling essentieel.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn rechtlijnig en hebben in de afgelopen jaren reeds hun waarde bewezen. Ze kunnen dan ook zeker leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de biodistributie en het therapeutische effect van verbeterde of nieuwe tumor-gerichte stoffen in muizen en ratten. De aanvragers nemen al jaren internationaal een vooraanstaande positie in dit onderzoeksveld in en hebben reeds voor meerdere middelen de basis gelegd voor een succesvolle introductie in de kliniek.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De schatting is gebaseerd op jarenlange evaluaties van eigen onderzoek. Het ongerief wordt met name veroorzaakt door het opwekken van tumoren, de tumorgroei, het toedienen van tumor-gerichte agentia en het herhaaldelijk bijkomen uit anesthesie noodzakelijk voor imaging procedures. Als gevolg hiervan ondergaat 4% van de muizen en 2% van de ratten licht ongerief (zij blijven tumor-vrij). De overgrote meerderheid van de dieren, 93% van de muizen en 90% van de ratten, ondergaat matig ongerief. Een kleine minderheid, 3% van de muizen en 8% van de ratten ondergaat ernstig ongerief als gevolg van therapie-experimenten.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Het voorafgaande in vitro werk is uitgebreid en reeds afgerond alvorens een tracer in een dierproef wordt gebruikt. Het in vivo gedrag van de tumor-gerichte stoffen kan alleen in dieren worden uitgetest die qua fysiologie voldoende overeenkomsten met mensen hebben. Het overgrote deel van de proeven wordt met, veelal immunodeficiente, muizen gedaan om humane tumoren te kunnen laten groeien. Daar waar een model een groter proefdier vereist wordt een rat (naar schatting 15% van het totaal aantal gevraagde dieren) gebruikt.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren en de grootte van de groepen in de experimenten is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. In het project worden een aantal tracers ontwikkeld en onderzocht op hun geschiktheid voor diagnose en therapie voor verschillende tumoren. Dit is een continu proces dat over vele jaren zou moeten leiden tot theranostische agentia voor elke specifieke tumor. Het definiëren van milestones is nog niet aan de orde. Wel is het evident dat een beproefde en gestandaardiseerde wijze van karakteriseren van de tracers na elke stap de ruimte

laat om de volgende stap te heroverwegen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 5000 muizen en 900 ratten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. In alle gevallen waarin dat nodig is worden verdoving en pijnbestrijding toegepast. Wanneer de dieren gedurende langere tijd verdoofd worden zullen zij op een warmtemat geplaatst worden om warmteverlies tegen te gaan. De gezondheid van de dieren wordt dagelijks gecheckt door de onderzoeker of een biotechnicus. Op die manier kunnen dieren die een humaan eindpunt bereiken op humane wijze gedood worden om onnodig lijden van de dieren te voorkomen. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd. Negatieve effecten op het milieu worden voorkomen door adequate huisvesting van de dieren en de vereiste voorzorgsmaatregelen bij het hanteren van onderzoeksmateriaal en het radioactieve of biologisch gevaarlijk afval.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Dit onderzoek is gericht op de ontwikkeling van tumor-specifieke tracers welke geschikt zijn om te gebruiken in de diagnose en therapie van kanker. Dit onderzoeksveld is sterk in ontwikkeling en deze onderzoeksgroep speelt hierin een gekende rol. Het is dan ook zeer aannemelijk dat het project zal leiden tot mogelijkheden tot betere detectie en behandeling van kanker bij de mens. Hierbij moet zeker het uitzicht op vroege detectie van de effectiviteit van therapieën, waardoor bij niet-aanslaan tijdig kan worden gestopt om patiënten niet onnodig te belasten, niet onbenoemd blijven. Gezien de ernst en de wijdverbreidheid van de aandoeningen waar het hier om gaat en gezien de grote behoefte aan 'gepersonaliseerde' therapie acht de DEC het belang van de beschreven doelstelling essentieel. De concrete doelstellingen zijn ook haalbaar en kunnen niet zonder dieren worden behaald.

Tegenover dit aanzienlijke belang staat dat 92% van de dieren matig en 4% ernstig ongerief zal ondervinden voornamelijk door het aanbrengen, volgen en behandelen van tumoren. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling zal worden gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning. Het resterende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De experimenten komen qua design overeen met wat in het onderzoeksveld gebruikelijk is.

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
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

p/ [REDACTED]

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD103002015209

**Bijlagen**

2

Datum 11-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015209. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 8 september 2015  
Geplande einddatum: 8 september 2020  
Titel project: Development of new tumor targeting agents for molecular imaging and therapy of cancer  
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling van tracers om tumoren zichtbaar te maken en kanker gericht te behandelen  
Naam DEC: RU DEC  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (627 DEC B4)  
E-mailadres DEC: dec@iwkv.umcn.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:


Nijmegen

Datum:

8 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
p/a [REDACTED]  
Postbus 9101  
6500 HB NIJMEGEN  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015209  
**Bijlagen**  
2

Datum 11-08-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 11 augustus 2015  
Vervaldatum: 10 september 2015  
Factuurnummer: 201570209

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvegrunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD103002015209 | € 741,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 25 augustus 2015 9:30  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag AVD103002015209

Beste [REDACTED],

Kanker komt zowel bij mannen als bij vrouwen voor. Het is daarom van belang om ons onderzoek in beide geslachten uit te voeren. Echter binnen een experiment gebruiken wij bij voorkeur een geslacht proefdieren, zodat de spreiding van de resultaten zo klein mogelijk blijft. Hierdoor kunnen we in experimenten met kleinere groepen proefdieren gebruiken (n=5). In een latere fase van het onderzoek dienen we in bepaalde projecten hormonale invloeden uit te sluiten, waarvoor we aldus enkele malen het andere geslacht zullen gebruiken. In het algemeen gebruiken we bij voorkeur vrouwelijke dieren, omdat mannetjes vaker vechten (wat huisvesting bemoeilijkt en uitval tot gevolg heeft). In het geval dat het onderzoek zich richt op tumor typen die alleen bij mannen voorkomen (zoals prostaatkanker, testis kanker, etc), maken we natuurlijk gebruik van mannelijke proefdieren. In de herziene aanvraag, onder de onderdelen 'choice and justification of animals' is een korte beschrijving hiervan opgenomen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

[REDACTED]

**Radboud University Medical Center**

[REDACTED]

P.O Box 9101  
6500 HB Nijmegen

[REDACTED]

[REDACTED]



---

**Van:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Verzonden:** maandag 17 augustus 2015 17:02  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** vraag AVD103002015209

Geachte [REDACTED]

Uw aanvraag getiteld: Development of new tumor targeting agents for molecular imaging and therapy of cancer met aanvraagnummer AVD103002015209 is bij de CCD aangeboden ter beoordeling. U beschrijft in de verschillende bijlagen dierproeven het gebruik van muizen en u beschrijft het huisvesten van de dieren in groepshuisvesting om

stress te reduceren. Kunt u nader toelichten of u mannelijke of vrouwelijke dieren gebruikt of dieren van beide geslachten.

Met vriendelijke groet [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
**Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag**  
.....

T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) (let op: nieuw emailadres!)

Het Radboudumc staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel in het handelsregister onder nummer 41055629. The Radboud university medical center is listed in the Commercial Register of the Chamber of Commerce under file number 41055629.

**Appendix****Description animal procedures**

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

**1 General information**

|     |   |  |   |
|-----|---|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>1                         | Type of animal procedure<br>Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in mice |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

The aim of the experiments is to determine the in vivo behaviour (e.g. tumor targeting, retention, clearance, etc) of new tumor targeting agents in animal models. For this purpose, the agent will be administered (e.g. i.v., i.p., etc) to the animal and subsequently the pharmacokinetics and biodistribution of the agent can be studied by means of biodistribution and/or imaging. In addition, the pharmacokinetics can be studied by for example blood sampling or urine collection.

A standard approach to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent includes the following experiment:

1. Dose optimization: determine which dose of the tumor targeting agent results in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue
2. Pharmacokinetics: Determine the pharmacokinetics of the tracer (e.g. how rapidly accumulates the tracer in the tumor and clears from normal tissue and circulation)
3. Imaging of the distribution of the tumor targeting agent in vivo

To quantitatively determine the in vivo behaviour of the tumor targeting agent we will use the following primary end points

- Tumor and normal tissue uptake measured by biodistribution study. In this set up the animal will be euthanized at a certain time point (e.g. 1h, 24h, 72h) after injection of the tumor targeting agent. The animals will be dissected and tumor and normal organs will be collected. The uptake in tissues of interest will be quantified by using for example a gamma counter. Aliquots of the injected tracer will be counted simultaneously.
- Tumor and normal tissue uptake measured by imaging. In this set up, the injection of the radiotracer will be followed by an imaging procedure (e.g. optical, SPECT or PET) under anesthesia. Since it is not necessary to euthanize the animal, this procedure can be repeated at several time points after injection. After the scan, a 3D image will be reconstructed and a region of interest will be drawn around the tumor and tissue of interest to quantitatively determine the activity concentration.
- Pharmacokinetics of a tracer will be determined by taking blood samples (e.g. via cheek puncture, tail cut) or urine samples. The tracer concentration can be measured by for example ELISA or by measuring the radioactive or fluorescent signal (e.g. in a gamma counter).

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed by our research group and by other international research groups. (1-5)

1.

4. Tolmachev V, Varasteh Z, Honarvar H, Hosseinimehr SJ, Eriksson O, Jonasson P, et al. Imaging of platelet-derived growth factor receptor beta expression in glioblastoma xenografts using affibody molecule <sup>111</sup>In-DOTA-Z09591. J Nucl Med. 2014;55(2):294-300.

5.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

---

In a standard experiment the first step is to inject or transplant the animals with a tumor. In case the tumor requires growth factors or hormones to grow, a growth factor pellet will be transplanted subcutaneously. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (on average this takes 2-3 weeks), the animal will be injected with the tumor targeting agent. After injection, blood samples can be collected to measure the pharmacokinetics of the tracer. Depending on how fast the tracer accumulates in the tumor and clears from the circulation, biodistribution and imaging studies will be performed at several time points (e.g. 1h, 24h, and 72h) after injection to quantitatively determine the biodistribution of the tracer. On average, these type of studies will take three weeks. However, in case of slow growing tumors or longitudinal studies, the total time an animal is in the experiment can be longer (maximum 6 months).

In more detail, the following experimental steps can be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under general anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less than a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.
- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplanation of the pellet will be performed in the same session.
- Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc.). The maximum number of injections of a tumor targeting agent is six. The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).



- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This can be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 15-20 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 100-150 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total. The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal (standard 1-2 per week, but if necessary the animals will be weighed daily). The duration is less than one minute.
- Measuring of tumor size using a caliper. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, and if necessary it will be measured daily. The duration is 2 minutes.
- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1 second to 3 hours. Most scans can be acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer <sup>18</sup>F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection (the maximum number of times fasting will be used is five times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15-23

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

---

In most studies we will use immunodeficient athymic mice, because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, mice tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the B16 melanoma cell line derived from C57BL/6, will be performed in C57Bl/6 mice). The most frequently used animal strains are:

Mice: BALB/c nude, BALB/c rj/nu, SCID, C57Bl/6, BALB/c and Swiss, C3H mice, FVB mice, CBA mice, NSG mice

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question.

For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Since cancer is a disease in both men and women, research can be carried out in both sexes. However, within one experiment we will select only one sex to minimize the variation within the groups and therefore the experiment can be carried out in smaller groups of animals. In general we will use female animals, because male animals more frequently fight. This results in additional stress, and in case of severe fighting this may incidentally cause problems with housing and loss of animals. However, in case research focuses on tumor types that only occur in male patients (e.g. prostate cancer, testis cancer, etc), we will use male animals. Also, for some research questions, hormones (e.g. testosterone/estradiol) play an important role and will influence whether male or female animals will be selected for the study.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 4,000 mice. This calculation is based on the following:

In order to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent, and to optimize it for imaging and therapy purposes, several experiments will be carried out.

- First, a dose-optimization study will be performed to determine which tracer dose will result in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue. In general we need six groups to optimize this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 30 animals per dose optimization study.

- Next, the pharmacokinetics will be studied by performing biodistribution studies at different time points. On average we will need eight groups of animals for this, which results in approximately 40 mice per pharmacokinetics study.

- In the third stage imaging will be performed. For this we will need approximately 10 animals.

Based on this, we estimate that we will need approximately 80 mice to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for imaging and therapy.

During the last three years, we have developed tumor targeting agents for several tumor associated antigens, [REDACTED]

For each target, different types of radiotracers can be designed, such as monoclonal antibodies or antibody fragments, nanobodies, affibody molecules, peptides, and small molecules. These agents differ in several aspects like affinity, size, tumor accumulation, clearance, etc. In addition, monomers, dimers, or heterodimers can be produced in order to increase the affinity and tumor targeting potential of these agents.

We expect to develop ten new radiotracers per year. In order to fully characterize and optimize these agents (dose optimization, pharmacokinetics, imaging) we will need 800 mice per year. In total this will result in 4,000 animals in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| mice    |        | 4000                      | 6-8 weeks  |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

### C. Re-use

---

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

---

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

---

### D. Replacement, reduction, refinement

---

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

---

Replacement:

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

Reduction:

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

Refinement:

The experiments will be carried out in mice and rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures itself. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research [REDACTED] and others has shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[REDACTED]

[REDACTED]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. J Nucl Med. 2010;51(6):892-7.

[REDACTED]

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

---

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researches or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted.  
To reduce axiety, mice will be housed in groups and not individually.  
If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.  
For imaging and biodistribution, only a very low dose (tracer dose) of the tumor targeting agent is required. Therefore, we do not expect that this will cause discomfort or side effects.

Environmental effects:

During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected seperately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

### G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

---

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress
- Discomfort due to tumor growth
- Injections or surgical procedures causing pain and stress
- Recovery from anesthesia
- Euthanasia

The tumor targeting agents themselves will not cause side effects or discomfort, since the injected dose is very low (tracer dose)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments start the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. In general, animals will be taken out of the experiment before tumors cause severe discomfort. However, in case tumors unexpectedly cause severe ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize

this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Based on extensive experiments with many different types of radiotracers, we do not expect that these tracers themselves will cause discomfort to the animals.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

---

#### **J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size > 2 cm<sup>3</sup>
  - Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
  - Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
  - Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).
- 

Indicate the likely incidence.

---

In most imaging and biodistribution studies the experiments will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and thus it is very unlikely that the humane end points are reached. Based on previous experience we expect this to be less than 1%.

---

#### **K. Classification of severity of procedures**

---

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe ).

---

We expect that 95% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 5% of the animals will experience mild discomfort, since we will not induce a tumor and perform imaging. In the exceptional situation that a tumor causes unexpected severe discomfort due to for example ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort. This will happen in less than 1% of the animals.

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

---

At the end of the study we will determine the biodistribution of the agent ex vivo. In addition, tumors or normal tissue can be analyzed immunohistochemically.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

---

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

---

Yes

---



## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

|     |   |  |  |
|-----|---|--|--|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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<br>2                         | Type of animal procedure<br>Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in mice |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

The aim of the experiments is to determine the therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in animal models for the treatment of cancer. Tumor targeting agents can be for example antibodies, peptides or small molecules. They can be used 'naked' or be labeled with beta- or alpha-emitting radionuclides (e.g. Lu-177, Y-90 or Bi-213) or cytotoxic drugs. In these experiments, the therapeutic efficacy of these agents will be compared with either the unlabeled compound or conventional anti-cancer treatment (e.g. chemotherapy, irradiation, surgical resection of the tumor, or cell-based therapies)

The primary outcome measurements of these experiments are:

#### 1) Toxicity

Toxicity will be assessed by measuring body weight and by analyzing blood and/or urine for hematological toxicity (hemoglobin, leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine). Body weight is a reliable indicator of the general health of the animal. In addition, chemotherapy or targeted radiotherapy can cause bonemarrow and kidney toxicity. This can be measured by analyzing blood samples for several hematological and renal parameters. Assessing the toxicity can not be performed in animal procedure 1, since in these studies only a tracer amount of the tumor targeting agent is administered, while the therapeutic dose is much higher (up to a 100 fold). (1-5)

#### 2) Tumor growth

Tumor growth can be measured by caliper measurements (in case of a subcutaneous tumor) or by non-invasive imaging techniques such as PET, SPECT or MRI (in case of an orthotopic tumor model such as prostate cancer, intraperitoneal tumors, liver metastases, etc). Both methods have shown to reliably monitor tumor growth. (1-5)

#### 3) Survival

Next to tumor growth, the survival is an important primary outcome measure to proof the therapeutic efficacy. Certain therapeutic agents may cause severe toxicity and therefore only measuring tumor growth is not sufficient. For example, tumor growth can be significantly inhibited during the first three weeks, but when the treatment causes severe hematological or renal toxicity, this may result in death of the animals. Thus, the overall effect of the treatment is not beneficial for the animal. In order to study survival, we will longitudinally monitor the animals until they die or have to be sacrificed based on the humane endpoint (e.g. tumor > 2 cm<sup>3</sup>, weight loss more than 25% compared to baseline, etc). (1-5)

#### 4) Assessment of molecular processes induced by treatment

Finally, the tumor targeting agent may induce molecular processes in the tumor that can be measured by non-invasive imaging or by analyzing the tumors by western blot or immunohistochemical stainings. An example of such a molecular process is a change in tumor cell proliferation that can be measured by 18F-FLT PET, or a change in glucose metabolism that can be measured with 18F-FDG PET. Changes in 18F-FLT or 18F-FDG often proceed the changes in tumor size as can be measured by caliper measurements and can therefore be used to predict response to treatment. (6, 7)

The experiments will be carried out in the following order:

The first step is to determine which dose results in optimal therapeutic efficacy without inducing severe toxicity (e.g. determination of the maximum tolerable dose (MTD)). The toxicity can be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to assess hematological (platelets,

leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine, urea). Next the therapeutic effect is monitored by measuring tumor growth and survival. Tumor growth can be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques (e.g. CT, MRI, PET, SPECT, optical, ultrasound). Finally, we can also study which molecular processes occur in tumors that were treated. Processes of interest are for example proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of growth factor receptor, activation of intracellular signaling pathways. These processes can be measured by non-invasive imaging techniques, or by collecting tumor samples for ex vivo analysis (immunohistochemistry, western blot, etc) at the end of the study.

[REDACTED]

---

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

In order to determine the therapeutic effect of tumor targeting agents, the following procedures can be carried out. The study will start with inoculation of a tumor. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (2-3 weeks) the therapy will be started. Tumor size will be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques. Toxicity will be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to analyze hematological and renal toxicity. Finally, the molecular processes in tumor (e.g. proliferation, apoptosis, etc) may be monitored by non-invasive imaging techniques, or by removing the tumor at the end of the study for ex vivo analysis (immunohistochemistry, westerblot, etc). The maximum time an animal is in an experiment is 12 months.

In more detail the following procedures will be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under generally anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same

time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less than a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.

- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplantation of the pellet will be performed in the same session
- Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The maximum number of injections is six. The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Administration of conventional anti-cancer therapy such as chemotherapy and antibody-based therapy (i.p., i.v., etc). Conventional anti-cancer therapy is generally injected intraperitoneally. However, certain agents can also be administered i.v., s.c., orally, etc. For example, small-molecule inhibitors like BRAF inhibitors require oral administration. Frequency: depends on the duration of the study. Therapy can be injected once, or in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Irradiation: Mice will undergo irradiation under general anesthesia (2 Gy - 10 Gy). Frequency: in general one dose of 10 Gy will be administered or radiation is administered fractionated (e.g. 3x3Gy). The duration of one irradiation session is approximately 10 minutes. Irradiation can be whole body (2 Gy) or only on the tumor (2 - 10 Gy).
- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This will be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 15-20 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 100-150 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total. The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal. However, standard bodyweight is measured 2-3 times a week, and if the general condition of the animal is getting worse the animals will be weighed daily. The duration is less than one minute.
- Measuring of tumor size. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, with a maximum of 7 times per week. The duration is 2 minutes.

- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1 second to 2 hours. Most scans are acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer <sup>18</sup>F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection. (the maximum number of times fasting will be used is five times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15–23

---

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

---

In most studies we will use immunodeficient athymic mice, because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, mice tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the B16 melanoma cell line derived from C57BL/6, will be performed in C57Bl/6 mice). The most frequently used animal strains are:

Mice: BALB/c nude, BALB/c rj/nu, SCID, C57Bl/6, BALB/c and Swiss, C3H mice, FVB mice, CBA mice, NSG mice

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question.

For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Since cancer is a disease in both men and women, research can be carried out in both sexes. However, within one experiment we will select only one sex to minimize the variation within the groups and therefore the experiment can be carried out in smaller groups of animals. In general we will use female animals, because male animals more frequently fight. This results in additional stress, and in case of severe fighting this may incidentally cause problems with housing and loss of animals. However, in case research focuses on tumor types that only occur in male patients (e.g. prostate cancer, testis cancer, etc), we will use male animals. Also, for some research questions, hormones (e.g. testosterone/estradiol) play an important role and will influence whether male or female animals will be selected for the study.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 1,000 mice. This calculation is based on the following:

In order to study the therapeutic efficacy we will perform the following studies:

- First, a dose-finding study will be performed to determine at what dose level tumor growth can be inhibited without causing severe toxicity. In general we will need five groups to determine this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 25 animals per dose-finding study.
- Next, the effect of therapy on tumor growth, survival, and toxicity will be assessed. On average we will need five groups of animals for this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 10, which results in approximately 50 mice per study.
- In the third stage we can assess the effect of treatment on molecular processes in the tumor (e.g. proliferation, apoptosis, growth factor receptor expression, etc). For this we will need approximately five groups of animals. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 5, which results in approximately 25 mice per study.

Based on this, we estimate that we will need approximately 100 mice to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for cancer therapy.

During the last three years, we have developed several tumor targeting agents directed against tumor associated antigens like HER2, TROP-2, CEA, and CAIX. In addition, we are developing new tumor targeting agents directed against PSMA.

We expect to develop two new tumor targeting agents per year. In order to study the therapeutic efficacy and toxicity of these agents we will need 200 mice per jaar. In total this will result in 1,000 mice in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| mice    |        | 1000                      | 6-8 weeks  |

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

### D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

---

**Replacement:**

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

**Reduction:**

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

**Refinement:**

The experiments will be carried out in mice and rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures themselves. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warm mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[Redacted text block]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. *J Nucl Med.* 2010;51(6):892-7.

[Redacted text block]

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

---

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.

Environmental effects:

During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

---



### **G. Location where the animals procedures are performed**

---

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

---

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

---

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

---

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

---

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (code 02)

- Discomfort due to tumor growth (code 03)
- Discomfort due to toxicity of treatment (code 03)
- Injections or surgical procedures causing pain and stress (code 03)
- Recovery from anesthesia (code 03)
- Euthanasia (code 02)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. However, in some studies, tumor size will be monitored longitudinally, for example when survival is studied. In this case, mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and in case the tumors causes severe discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

New tumor targeting agents can cause toxicity to the animal and this will be carefully monitored. The animals will be checked daily by the researcher or biotechnician and body weight will be measured up to 7 times a week. In case mice suffer from severe toxicity, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

## **J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size of 2 cm<sup>3</sup>
- Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
- Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
- Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).

Treatment induced toxicity will cause changes in the humane endpoint as described above. Therefore, no treatment specific endpoints are described.

Indicate the likely incidence.

The most likely primary end point to be met in these studies is tumor size of 2 cm<sup>3</sup> or ulceration or invasive tumor growth that causes discomfort to the animal. However, in most cases experiments start when the tumors are approximately 0.1 cm<sup>3</sup> and it is unlikely that the tumor reach one of the humane endpoints. However, in some studies the mice will be followed for longer periods (e.g. to measure survival) and they may reach one of these end points. We expect that this will occur in 20% 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 ).

**We expect that 85% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 15% of the animals will experience severe discomfort and will reach the humane end point, for example in therapy experiments due to tumor growth up to 10% of the body weight (2 cm<sup>3</sup>)**

## **End of experiment**

**L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

---

At the end of the study we will collect tumor tissue to analyze molecular processes in the tumor.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

---

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

---

Yes

---

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>3</td><td>Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in rats</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 3 | Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in rats |
| Serial number | Type of animal procedure  |   |               |                          |   |   |
| 3             | Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in rats   |   |               |                          |   |   |

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

The aim of the experiments is to determine the in vivo behaviour (e.g. tumor targeting, retention, clearance, etc) of new tumor targeting agents in animal models. For this purpose, the agent will be administered (e.g. i.v., i.p., etc) to the animal and subsequently the pharmacokinetics and biodistribution of the agent can be studied by means of biodistribution and/or imaging. In addition, the pharmacokinetics can be studied by for example blood sampling or urine collection.

A standard approach to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent includes the following experiment:

1. Dose optimization: determine which dose of the tumor targeting agent results in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue
2. Pharmacokinetics: Determine the pharmacokinetics of the tracer (e.g. how rapidly accumulates the tracer in the tumor and clears from normal tissue and circulation)
3. Imaging of the distribution of the tumor targeting agent in vivo

To quantitatively determine the in vivo behaviour of the tumor targeting agent we will use the following primary end points

- Tumor and normal tissue uptake measured by biodistribution study. In this set up the animal will be euthanized at a certain time point (e.g. 1h, 24h, 72h) after injection of the tumor targeting agent. The animals will be dissected and tumor and normal organs will be collected. The uptake in tissues of interest will be quantified by using for example a gamma counter. Aliquots of the injected tracer will be counted simultaneously.
- Tumor and normal tissue uptake measured by imaging. In this set up, the injection of the radiotracer will be followed by an imaging procedure (e.g. optical, SPECT or PET) under anesthesia. Since it is not necessary to euthanize the animal, this procedure can be repeated at several time points after injection. After the scan, a 3D image will be reconstructed and a region of interest will be drawn around the tumor and tissue of interest to quantitatively determine the activity concentration.
- Pharmacokinetics of a tracer will be determined by taking blood samples (e.g. via cheek puncture, tail cut) or urine samples. The tracer concentration can be measured by for example ELISA or by measuring the radioactive or fluorescent signal (e.g. in a gamma counter).

These outcome parameters have successfully been used in previous studies performed

4. Tolmachev V, Varasteh Z, Honarvar H, Hosseinimehr SJ, Eriksson O, Jonasson P, et al. Imaging of platelet-derived growth factor receptor beta expression in glioblastoma xenografts using affibody molecule <sup>111</sup>In-DOTA-Z09591. J Nucl Med. 2014;55(2):294-300.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

---

In a standard experiment the first step is to inject or transplant the animals with a tumor. In case the tumor requires growth factors or hormones to grow, a growth factor pellet will be transplanted subcutaneously. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (on average this takes 2-3 weeks), the animal will be injected with the tumor targeting agent. After injection, blood samples can be collected to measure the pharmacokinetics of the tracer. Depending on how fast the tracer accumulates in the tumor and clears from the circulation, biodistribution and imaging studies will be performed at several time points (e.g. 1h, 24h, and 72h) after injection to quantitatively determine the biodistribution of the tracer. On average, these type of studies will take three weeks. However, in case of slow growing tumors or longitudinal studies, the total time an animal is in the experiment can be longer (maximum 6 months).

In more detail, the following procedures can be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under general anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less than a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.
- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplantation of the pellet will be performed in the same session.
- Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. The maximum number of injections is six. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This can be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 20-30 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 200-250 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via

cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total. The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).

- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal (standard 1-2 per week, but if necessary the animals will be weighed daily). The duration is less than one minute.
- Measuring of tumor size using a caliper. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, and if necessary it will be measured daily. The duration is 2 minutes.
- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1 second to 3 hours. Most scans can be acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer <sup>18</sup>F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection (fasting will be performed with a maximum of 5 times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15-23

---

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

---

In general, new tumor targeting agents can be tested in mice. However, sometimes rat models are preferred over mice models because of their larger size. For example, we have developed a reliable rat model for colorectal cancer liver metastases, where the tumor cells are injected in the portal vein. This is a realistic metastatic colorectal cancer model, which is difficult to set up in mice because of the very small size of the portal vein. In most studies we will use immunodeficient animals because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, rat tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the CC531 colon carcinoma cell line derived from Wag/Rij, will be performed in Wag/Rij rats). The most frequently used animal strains are:

Rat: Wistar, Lewig, Wag/Rij, BN, Sprague Dawley

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question. For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.



Since cancer is a disease in both men and women, research can be carried out in both sexes. However, within one experiment we will select only one sex to minimize the variation within the groups and therefore the experiment can be carried out in smaller groups of animals. In general we will use female animals, because male animals more frequently fight. This results in additional stress, and in case of severe fighting this may incidentally cause problems with housing and loss of animals. However, in case research focuses on tumor types that only occur in male patients (e.g. prostate cancer, testis cancer, etc), we will use male animals. Also, for some research questions, hormones (e.g. testosterone/estradiol) play an important role and will influence whether male or female animals will be selected for the study.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 400 rats. This calculation is based on the following:

In order to study the in vivo behaviour of a new tumor targeting agent, and to optimize it for imaging and therapy purposes, several experiments will be carried out.

- First, a dose-optimization study will be performed to determine which tracer dose will result in the highest tumor uptake with relative low uptake in normal tissue. In general we need six groups to optimize this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 30 animals per dose optimization study.

- Next, the pharmacokinetics will be studied by performing biodistribution studies at different time points. On average we will need eight groups of animals for this, which results in approximately 40 rats per pharmacokinetics study.

- In the third stage imaging will be performed. For this we will need approximately 10 animals.

Based on this, we estimate that we will need approximately 80 to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for imaging and therapy.

During the last three years, we have developed tumor targeting agents for several tumor associated antigens, eg: HER2, IGF-1R, EGFR, TROP-2,

For each target, different types of radiotracers can be designed, such as monoclonal antibodies or antibody fragments, nanobodies, affibody molecules, peptides, and small molecules. These agents differ in several aspects like affinity, size, tumor accumulation, clearance, etc. In addition, monomers, dimers, or heterodimers can be produced in order to increase the affinity and tumor targeting potential of these agents.

We expect to develop one new radiotracers per year that has to be tested in rats. In order to fully characterize and optimize these agents (dose optimization, pharmacokinetics, imaging) we will need 80 rats per year. In total this will result in 400 animals in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| rat     |        | 400                       | 6-8 weeks  |

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

##### Replacement:

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

##### Reduction:

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

##### Refinement:

The experiments will be carried out in rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. In general, new tumor targeting agents can be tested in mice. However, sometimes rat models are preferred over mice models because of their larger size. For example, we have developed a reliable rat model for colorectal cancer liver metastases, where the tumor cells are injected in the portal vein. This is a realistic metastatic colorectal cancer model, which is difficult to set up in mice because of the very small size of the portal vein.

Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures themselves. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[REDACTED]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. J Nucl Med. 2010;51(6):892-7.

[REDACTED]

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

---

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort. For imaging and biodistribution, only a very low dose (tracer dose) of the tumor targeting agent is required. Therefore, we do not expect that this will cause discomfort or side effects. Environmental effects: During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

Not applicable

## Accommodation and care

## **F. Accommodation and care**

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

## **G. Location where the animals procedures are performed**

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

# **Classification of discomfort/humane endpoints**

## **H. Pain and pain relief**

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

---

## **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress
- Discomfort due to tumor growth
- Injections or surgical procedures causing pain and stress
- Recovery from anesthesia
- Euthanasia

The tumor targeting agents themselves will not cause side effects or discomfort, since the injected dose is very low (tracer dose)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments start the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment. The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. In general, animals will be taken out of the experiment before tumors cause severe discomfort. However, in case tumors unexpectedly cause severe ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort and will be taken out of the experiment. We expect that this will happen in less than 1% of the animals.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

Based on extensive experiments with many different types of radiotracers, we do not expect that these tracers themselves will cause discomfort to the animals.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

---

## **J. Humane endpoints**

---

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size > 2 cm<sup>3</sup>
  - Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
  - Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
  - Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).
- 

Indicate the likely incidence.

---

In most imaging and biodistribution studies the experiments will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and thus it is very unlikely that the humane end points are reached. Based on previous experience we expect this to be less than 1%.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe ).

---

We expect that 95% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 5% of the animals will experience mild discomfort, since we will not induce a tumor and perform imaging. In the exceptional situation that a tumor causes unexpected severe discomfort due to for example ulceration or invasive growth, the animal may experience severe discomfort. This will happen in less than 1% of the animals.

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

**L. Method of killing**

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

At the end of the study we will determine the biodistribution of the agent ex vivo. In addition, tumors or normal tissue can be analyzed immunohistochemically.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

Yes

## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

| 1.1           | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.                                  | 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. | <table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>4</td><td>Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in rats</td></tr></tbody></table> | Serial number | Type of animal procedure | 4 | Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in rats |
| Serial number | Type of animal procedure  |  |               |                          |   |  |
| 4             | Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in rats  |  |               |                          |   |  |



## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

---

The aim of the experiments is to determine the therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in animal models for the treatment of cancer. Tumor targeting agents can be for example antibodies, peptides or small molecules. They can be used 'naked' or be labeled with beta- or alpha-emitting radionuclides (e.g. Lu-177, Y-90 or Bi-213) or cytotoxic drugs. In these experiments, the therapeutic efficacy of these agents will be compared with either the unlabeled compound or conventional anti-cancer treatment (e.g. chemotherapy, irradiation, surgical resection of the tumor, or cell-based therapies)

The primary outcome measurements of these experiments are:

#### 1) Toxicity

Toxicity will be assessed by measuring body weight and by analyzing blood and/or urine for hematological toxicity (hemoglobin, leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine). Body weight is a reliable indicator of the general health of the animal. In addition, chemotherapy or targeted radiotherapy can cause bonemarrow and kidney toxicity. This can be measured by analyzing blood samples for several hematological and renal parameters. Assessing the toxicity can not be performed in animal procedure 1, since in these studies only a tracer amount of the tumor targeting agent is administered, while the therapeutic dose is much higher (up to a 100 fold). (1-5)

#### 2) Tumor growth

Tumor growth can be measured by caliper measurements (in case of a subcutaneous tumor) or by non-invasive imaging techniques such as PET, SPECT or MRI (in case of an orthotopic tumor model such as prostate cancer, intraperitoneal tumors, liver metastases, etc). Both methods have shown to reliably monitor tumor growth. (1-5)

#### 3) Survival

Next to tumor growth, the survival is an important primary outcome measure to proof the therapeutic efficacy. Certain therapeutic agents may cause severe toxicity and therefore only measuring tumor growth is not sufficient. For example, tumor growth can be significantly inhibited during the first three weeks, but when the treatment causes severe hematological or renal toxicity, this may result in death of the animals. Thus, the overall effect of the treatment is not beneficial for the animal. In order to study survival, we will longitudinally monitor the animals until they die or have to be sacrificed based on the humane endpoint (e.g. tumor > 2 cm<sup>3</sup>, weight loss more than 25% compared to baseline, etc). (1-5)

#### 4) Assessment of molecular processes induced by treatment

Finally, the tumor targeting agent may induce molecular processes in the tumor that can be measured by non-invasive imaging or by analyzing the tumors by western blot or immunohistochemical stainings. An example of such a molecular process is a change in tumor cell proliferation that can be measured by <sup>18</sup>F-FLT PET, or a change in glucose metabolism that can be measured with <sup>18</sup>F-FDG PET. Changes in <sup>18</sup>F-FLT or <sup>18</sup>F-FDG often proceed the changes in tumor size as can be measured by caliper measurements and can therefore be used to predict response to treatment. (6, 7)

The experiments will be carried out in the following order:

The first step is to determine which dose results in optimal therapeutic efficacy without inducing severe toxicity (e.g. determination of the maximum tolerable dose (MTD)). The toxicity can be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to assess hematological (platelets, leucocytes, thrombocytes) and renal toxicity (creatinine, urea). Next the therapeutic effect is monitored by measuring tumor growth and survival.

Tumor growth can be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques (e.g. CT, MRI, PET, SPECT, optical, ultrasound). Finally, we can also study which molecular processes occur in tumors that were treated. Processes of interest are for example proliferation, apoptosis, angiogenesis, expression of growth factor receptor, activation of intracellular signaling pathways. These processes can be measured by non-invasive imaging techniques, or by collecting tumor samples for ex vivo analysis (immunohistochemistry, western blot, etc) at the end of the study.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

In order to determine the therapeutic effect of tumor targeting agents, the following procedures can be carried out. The study will start with inoculation of a tumor. When the tumor reaches a size of approximately 0.1 cm<sup>3</sup> (2-3 weeks) the therapy will be started. Tumor size will be monitored by caliper measurements or non-invasive imaging techniques. Toxicity will be assessed by measuring body weight and by taking blood samples to analyze hematological and renal toxicity. Finally, the molecular processes in tumor (e.g. proliferation, apoptosis, etc) may be monitored by non-invasive imaging techniques, or by removing the tumor at the end of the study for ex vivo analysis (immunohistochemistry, westerblot, etc). The maximum time an animal is in the experiment is 12 months.

In more detail the following procedures will be carried out:

- Injection of tumor cells (one or two sided, i.p., i.v., s.c., i.m., orthotopically, intracardially, etc). If necessary, discomfort will be minimized by performing the procedure under generally anesthesia and administering analgesics (e.g. carprofen, temgesic, etc). Frequency: in most cases only one injection of tumor cells will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumor cells will be injected. Depending on how fast the tumors grow, they will be injected at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell injections. The injection takes less then a minute. Orthotopic injection may last longer, depending on site of injection.

- Transplantation of tumor tissue. This procedure will be carried out under general anesthesia and if necessary analgesics will be administered. Frequency: in most cases only one tumor transplantation will be performed (one tumor per animal). In certain studies (e.g. imaging studies with a receptor positive and receptor negative tumor in one animal), two types of tumors will be transplanted. Depending on how fast the tumors grow, they will be transplanted at the same time, or there will be a certain time interval (e.g. 1 week) between the two tumor cell transplantation. Subcutaneous transplantations will take approximately 10 minutes. Orthotopic transplantations may last longer, depending on site of transplantation.
- Particular tumors require hormones or growth factor in order to grow in mice (for example certain breast cancer cells require estrogen to grow). These will be administered by transplanting a growth factor pellet subcutaneously. This procedure will be performed once and under general anesthesia. It will take approximately 10 min. When the injection/transplantation of the tumor cells also requires anesthesia, the transplanation of the pellet will be performed in the same session - Administration of tumor targeting agent (i.p., i.v., orally, s.c., etc.) In general, tumor targeting agents will be injected intravenously. However, in certain studies we can choose a different administration route. For example, in case of intraperitoneal tumor growth of ovarian cancer, the tracer can be injected intraperitoneally as well. Frequency: In most studies the tumor targeting agent will be injected once. However, in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The maximum number of injections is six. The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Administration of conventional anti-cancer therapy such as chemotherapy and antibody-based therapy (i.p., i.v., etc). Conventional anti-cancer therapy is generally injected intraperitoneally. However, certain agents can also be administered i.v., s.c., orally, etc. For example, small-molecule inhibitors like BRAF inhibitors require oral administration. Frequency: depends on the duration of the study. Therapy can be injected once, or in case of longitudinal studies, agents can be injected multiple times (e.g. every other day, weekly, etc). The duration of injection is approximately 1 minute (depending on the type of injection).The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Irradiation: Mice will undergo irradiation under general anesthesia (2 Gy - 10 Gy). Frequency: in general one dose of 10 Gy will be administered or radiation is administered fractionated (e.g. 3x3Gy). The duration of one irradiation session is approximately 10 minutes. Irradiation can be whole body (2 Gy) or only on the tumor (2 - 10 Gy).
- Blood sampling (for example via cheek puncture, orbital puncture, tail cut). This will be performed multiple times. The exact method and frequency will depend on the amount of blood that is required to answer the research question. In case the clearance of the tumor targeting agent is studied, 20-30 ul blood will be taken via a tail cut. This can be performed up to 7 times per week (maximum 10 samples). In case blood is collected for further laboratory analysis of for example leucocytes, hemoglobin or creatinin, 200-250 ul blood (max 7.5% of blood volume) will be taken via cheekpuncture. This can be performed once per week, with a maximum of 10 samples in total.The duration depends on the procedure (cheek puncture: 5 min, tail cut: 3 min). The guidelines published in "A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes" will be followed (reference 1).
- Weighing of animals. The frequency depends on the research question and the general condition of the animal. However, standard bodyweight is measured 2-3 times a week, and if the general condition of the animal is getting worse the animals will be weighed daily. The duration is less then one minute.
- Measuring of tumor size. In case tumor size is relevant for the research question, it will be measured 2-3 times per week, with a maximum of 7 times per week. The duration is 2 minutes.
- Imaging under general anesthesia. The frequency depends on the research question. However, the maximum number of times an animal is allowed to recover from anesthesia after imaging is 3 times within one week. The duration of the scan depends on the imaging modalities and ranges from 1

second to 2 hours. Most scans are acquired in less than 1 hour. In case the radiotracer 18F-FDG is used for PET imaging, the animals will be fasted for a maximum of 12 h prior to injection. (the maximum number of times fasting will be used is five times).

Reference 1: Karl-Heinz Diehl et al. Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology 2001;21;15–23

---

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into account to minimise the number of animals.

---

In order to minimize the number of animals all tracers will first be evaluated in vitro. Only tracers that show favorable in vitro characteristics (e.g. high affinity, internalization, immunoreactivity) will be selected for in vivo studies.

For each experiment a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. If necessary, a biostatistician will be consulted to assist in these power calculations.

## **B. The animals**

---

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

---

In general, new tumor targeting agents can be tested in mice. However, sometimes rat models are preferred over mice models because of their larger size. For example, we have developed a reliable rat model for colorectal cancer liver metastases, where the tumor cells are injected in the portal vein. This is a realistic metastatic colorectal cancer model, which is difficult to set up in mice because of the very small size of the portal vein. In most studies we will use immunodeficient rats, because in these models human tumors can be grown without immunological rejection. For some studies, rat tumor cell lines will be used and they will be grown in syngeneic models (e.g. studies with the CC531 colon carcinoma cell line derived from Wag/Rij, will be performed in Wag/Rij rats). The most frequently used animal strains are:

Rats: Wistar, Lewis, Wag/Rij, BN, Sprague Dewley

However, other strains can be used if literature research or previous experiments indicate that this is required to answer the research question.

For most studies, animals will be 6-8 weeks old at start of the experiment. However, for specific research questions, e.g. imaging agents that specifically target tumors in young or elderly mice, animals of the appropriate age will be used.

Since cancer is a disease in both men and women, research can be carried out in both sexes. However, within one experiment we will select only one sex to minimize the variation within the groups and therefore the experiment can be carried out in smaller groups of animals. In general we will use female animals, because male animals more frequently fight. This results in additional stress, and in case of severe fighting this may incidentally cause problems with housing and loss of animals. However, in case research focuses on tumor types that only occur in male patients (e.g. prostate cancer, testis cancer, etc), we will use male animals. Also, for some research questions, hormones (e.g. testosterone/estradiol) play an important role and will influence whether male or female animals will be selected for the study.

Based on animal experiments that were performed by our research group in 2012-2014 we expect to use a maximum of 500 rats. This calculation is based on the following:

In order to study the therapeutic efficacy we will perform the following studies:

- First, a dose-finding study will be performed to determine at what dose level tumor growth can be inhibited without causing severe toxicity. In general we will need five groups to determine this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average five. This results in approximately 25 animals per dose-finding study.

- Next, the effect of therapy on tumor growth, survival, and toxicity will be assessed. On average we will need five groups of animals for this. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 10, which results in approximately 50 mice per study.

- In the third stage we can assess the effect of treatment on molecular processes in the tumor (e.g. proliferation, apoptosis, growth factor receptor expression, etc). For this we will need approximately five groups of animals. Depending on the power calculation, the number of animals per group is on average 5, which results in approximately 25 rats per study.

Based on this, we estimate that we will need approximately 100 rats to fully characterize and optimize a new tumor targeting agent for cancer therapy.

During the last three years, we have developed several tumor targeting agents directed against tumor associated antigens like [REDACTED].

We expect to develop one new tumor targeting agents for therapy per year. In order to study the therapeutic efficacy and toxicity of these agents we will need 100 rats per jaar. In total this will result in 500 rats in five years.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------|---------------------------|------------|
| Rat     |        | 500                       | 6-8 weeks  |

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

**D. Replacement, reduction, refinement**

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

---

**Replacement:**

Any new agent will first be characterized extensively in vitro. Only agents with promising characteristics will be applied in animals to study their in vivo behaviour. The aim of the studies is to determine the in vivo behaviour of tumor targeting agents (e.g. tumor targeting, clearance, etc). This can only be performed in living animals and there are currently no alternative models to get these data without the use of animals.

**Reduction:**

Before each experiment we will perform a literature search to find all information relevant for the animal experiment. In addition, a power calculation will be performed based on data from literature and previous experiments to determine the minimum amount of animals needed. We will also take into account drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth, etc. In case necessary, a biostatistician will be involved in the power calculation.

**Refinement:**

The experiments will be carried out in mice and rats because there are no alternatives to study the in vivo behaviour of tumor targeting agents in lower animal species. Most experimental procedures will only cause moderate discomfort or less. The use of anesthesia and analgesics is in general not required and may cause even more discomfort than the experimental procedures themselves. However, if necessary (e.g. after orthotopic or intracardial injection of tumor cells), anesthesia and analgesics will be applied. During imaging procedures and surgical procedures (when the animal is anesthetized), they will be placed on a warm mattress to prevent heat loss. To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually. The general health of the animals will be monitored daily by the researcher and/or the biotechnician. The methods that we use are well established and the experiments will be performed by experienced researchers. Previous research by our group and others has shown the translational value of this type of studies. Several tumor targeting agents that have been developed in animal models have been translated successfully into the clinic (1-6)

[Redacted text block]

4. Baum RP, Prasad V, Muller D, Schuchardt C, Orlova A, Wennborg A, et al. Molecular imaging of HER2-expressing malignant tumors in breast cancer patients using synthetic <sup>111</sup>In- or <sup>68</sup>Ga-labeled affibody molecules. *J Nucl Med.* 2010;51(6):892-7.

[Redacted text block]

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

---

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted.

To reduce anxiety, mice will be housed in groups and not individually.

If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort.

Environmental effects:

During and after the experiments, radioactive or biohazardous waste will be collected separately and removed according to the university guidelines.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

---

### G. Location where the animals procedures are performed

---

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

---

### **G. Location where the animals procedures are performed**

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

---

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

---

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

---

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

---

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?

---

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (code 02)
- Discomfort due to tumor growth (code 03)
- Discomfort due to toxicity of treatment (code 03)
- Injections or surgical procedures causing pain and stress (code 03)



- Recovery from anesthesia (code 03)
- Euthanasia (code 02)

Explain why these effects may emerge.

---

Stress can be caused by the handling of the animals, injections, and other experimental procedures. In addition, the animals can suffer from the recovery from anesthesia after the imaging procedure.

Indicate which measures will be adopted to prevent occurrence or minimise severity.

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. However, in some studies, tumor size will be monitored longitudinally, for example when survival is studied. In this case, mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and in case the tumors causes severe discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

New tumor targeting agents can cause toxicity to the animal and this will be carefully monitored. The animals will be checked daily by the researcher or biotechnician and body weight will be measured up to 7 times a week. In case mice suffer from severe toxicity, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

## **J. Humane endpoints**

---

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

---

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

---

Animals will be taken out of the experiments and humanely euthanized if one the following humane endpoints is reached:

- Tumor size of 2 cm<sup>3</sup>
- Ulceration or invasive tumor growth causing discomfort to the animal
- Abnormal motility due to tumor growth (severely reduced motility)
- Other signs of clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment).

Treatment induced toxicity will cause changes in the humane endpoint as described above. Therefore, no treatment specific endpoints are described.

---

Indicate the likely incidence.

---

To reduce stress, animals will be housed in groups and not individually. In addition, before the experiments starts the animals will be housed for a week in order to acclimatise to their new environment.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors, ulcerating tumors or invasive tumors. In most studies, the experiment will start when the tumor is only 0.1 cm<sup>3</sup> and therefore the tumor not likely to cause discomfort due to size, ulceration or invasive growth. However, in some studies, tumor size will be monitored longitudinally, for example when survival is studied. In this case, mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and in case the tumors causes severe discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

New tumor targeting agents can cause toxicity to the animal and this will be carefully monitored. The animals will be checked daily by the researcher or biotechnician and body weight will be measured up to 7 times a week. In case mice suffer from severe toxicity, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints.

Recovery from anesthesia is causing discomfort to the animal. However, this is required in case of imaging of a living animal. In order to minimize this discomfort, the maximum number of times an animal recovers from anesthesia is three times a week and after the last scan, the animal will be euthanized before it recovers from anesthesia. During the anesthesia the animal will be placed on a warmth mattress to prevent heat loss.

The experiments will be carried out by experienced researchers who have been trained to perform these type of studies.

#### **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 ).

---

**We expect that 85% of the animals will experience moderate discomfort, because either tumor growth is induced or the animals will have to recover from anesthesia which is required for the imaging procedures. The remaining 15% of the animals will experience**

**severe discomfort and will reach the humane end point, for example in therapy experiments due to tumor growth up to 10% of the body weight (2 cm<sup>3</sup>)**

## **End of experiment**

### **L. Method of killing**

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

---

At the end of the study we will collect tumor tissue to analyze molecular processes in the tumor.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

---

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

---

Yes

---



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Geert Groteplein 10  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen  
Nijmegen

**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  
AVD103002015209

**Uw referentie**

Datum 2 september 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
2

Geachte heer/mevrouw,

Op 8 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Development of new targeting agents for molecular imaging therapy of cancer met aanvraagnummer AVD103002015209. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 26 augustus 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld in antwoord op vragen van de CCD.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project Development of new targeting agents for molecular imaging therapy of cancer starten. De vergunning wordt afgegeven van 08 september 2015 tot en met 08 september 2020

**Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1d en lid 3 van de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang.

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

- Hiervan deel uitmakend: - DEC-advies  
- Weergave wet- en regelgeving



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
Adres: Geert Groteplein 10  
Postcode en woonplaats: 6500 HB Nijmegen  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 08 september 2015 tot en met 08 september 2020, voor het project Development of new targeting agents for molecular imaging therapy of cancer met aanvraagnummer AVD103002015209, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU-DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening> op 08 augustus 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 08 augustus 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 08 augustus 2015;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag; herziening van het projectplan ontvangen op 26 augustus 2015.

### Dierproeven

| Naam dierproef  | Diersoort | Aantal dieren | Ernst                    | Voorwaarden            |
|---|-----------|---------------|--------------------------|------------------------|
| characterization of in vivo behaviour of new targeting agents               | muizen    | 4000/ 5jaar   | 95% matig<br>5% licht    | Inzet beide geslachten |
| Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in mice    | muizen    | 1000/ 5 jaar  | 85% matig<br>15% ernstig | Inzet beide geslachten |
| Characterization of in vivo behaviour of new tumor targeting agents in rats | ratten    | 400/ 5 jaar   | 95% matig<br>5% licht    | Inzet beide geslachten |
| Assessment of therapeutic efficacy of new tumor targeting agents in rats    | ratten    | 500/ 5 jaar   | 85% matig<br>15% ernstig | Inzet beide geslachten |

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd, omdat de ongerief classificatie ernstig is toegekend in een aantal dierproeven. Deze beoordeling zal uiterlijk augustus 2020 plaatsvinden.

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De Instantie voor Dierenwelzijn houdt er toezicht op dat in de dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen worden gebruikt. Tenzij de onderzochte ziekte dit uitsluit doordat deze ziekte alleen in mannen dan wel in vrouwen voorkomt.

Zo doende wordt voorkomen dat surplusdieren in voorraad moeten worden gedood. Het aanpassen van de huisvesting, bijvoorbeeld het solitair huisvesten van mannelijke dieren is inherent aan deze voorwaarde.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade



zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13d is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.

#### **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. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk augustus 2020 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 van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.