

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
	NTS 20151210								
1	Aanvraagformulier						x	x	
2	Brief mbt factuurinformatie						x	x	
3	Ontvangstbevestiging						x	x	
4	Beschikking en vergunning						x	x	
5	Niet-technische samenvatting	x							
6	Projectvoorstel						x	x	
7	Bijlagen dierproeven			x					
8	Appendix 3 en 4			x				x	
9	Tabel breeding			x					
10	Appendix 1 en 2			x					
11	Tabel year			x					
12	DEC advies				x		x	x	
13	Advies CCD		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 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
 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	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-Noord 9
Postbus	9102
Postcode en plaats	6525EZ 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 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.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 [redacted] Dhr. Mw.
- Functie Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling [redacted]
- Telefoonnummer [redacted]
- E-mailadres [redacted]
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 07 . 09 . 2015
- Einddatum 07 . 09 . 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Language related genes in neurodevelopment and brain function
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de invloed van taalgenen op de hersenontwikkeling en hersenfunctie
- 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 (627 DEC B4)
- E-mailadres [redacted]

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 07 - 08 - 2015 

Handtekening 

10300



Radboud universitair medisch centrum
Concernstaf, sectie Kwaliteit en Veiligheid

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen
Huispost 628
Geert Grooteplein 10

Geert Grooteplein 10
Postbus 9101
6500 HB Nijmegen


www.radboudumc.nl

KvK 41055629/4

Datum Instantie voor Dierenwelzijn
7 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).

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 crediteuren Postbus 9101 6500HB, Nijmegen
Kostenplaats en kostensoort:	040823-461220
CDL projectnummer:	2015-0038
Verantwoordelijk onderzoeker:	

Bij voorbaat dank.

Met vriendelijke groeten


Instantie voor Dierenwelzijn




> 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.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015210

Bijlagen

2

Datum 13-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015210. 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. 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 9
Postbus: 9102
Postcode en plaats: 6525 EZ 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 plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: 0 [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl

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: 7 september 2015
Geplande einddatum: 7 september 2020
Titel project: Language related genes in neurodevelopment and brain function
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de invloed van taalgenen op de hersenontwikkeling en hersenfunctie
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
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:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

7 augustus 2015



> 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.zbo-ccd.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD103002015210

Bijlagen

2

Datum 13-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 augustus 2015

Vervaldatum: 12 september 2015

Factuurnummer: 201570210

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015210	€ 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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9102
6525EZ Nijmegen


Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015210

Bijlagen
1

Datum 21 september 2015

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw 

Op 8 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Language related genes in neurodevelopment and brain function' met aanvraagnummer AVD103002015210. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De onderzoeker zal zowel de go/no-go momenten als de criteria om een optionele behandeling uit te voeren met de IvD afstemmen. U kunt met uw project 'Language related genes in neurodevelopment and brain function' starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 september 2015 tot en met 7 september 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RUDEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 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. 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.

Datum
21 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015210

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. 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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Geert Groteplein-Noord 9
Postcode en woonplaats: 6525EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 september 2015 tot en met 7 september 2020, voor het project 'Language related genes in neurodevelopment and brain function' met aanvraagnummer AVD103002015210, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen per post op 11 augustus 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 8 augustus 2015;
 - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 8 augustus 2015;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie RUDEC d.d. 6 augustus 2015 en ontvangen op 8 augustus 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren voor het vergunde tijdvak	Ernst
Stock breeding without discomfort and organ extraction	Muizen (<i>Mus musculus</i>); C57BL6J;	5680	Licht en terminaal
Breeding with discomfort and organ extraction	Muizen (<i>Mus musculus</i>); C57BL6J;	3400	Licht, matig en terminaal
Substance administration and organ extraction	Muizen (<i>Mus musculus</i>); C57BL6J;	2760	Matig en terminaal
Behavioral testing and organ extraction	Muizen (<i>Mus musculus</i>); C57BL6J;	1440	Licht

Voorwaarde:

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

De onderzoeker zal zowel de go/no-go momenten als de criteria om een optionele behandeling uit te voeren met de IvD afstemmen.

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

Datum
21 september 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015210

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.



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).
- 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. | Language related genes in neurodevelopment and brain function |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input 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 syndromes in which the proper establishment of functional language is disrupted— such as autism, developmental dyspraxia and speech/language impairments - have a major impact on the educational, social and mental wellbeing of modern society. Extensive evidence indicates the importance of multifactorial genetic causes underlying these disorders. Knowledge of both the neuronal and molecular mechanisms that are disturbed in language-related disorders can lead to improvements for affected people, including early diagnosis of those at risk, and development of novel therapies. In the last decade, researchers have begun to investigate quantitative associations between particular candidate gene loci and common cases of disrupted language skills, and there have been notable successes in uncovering the molecular background of multiple disorders with a language-related phenotype (For review, see Genetics of speech and language disorders, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2011. 12:145–64 and Neurogenomics of speech and language disorders: the road ahead. *Deriziotis and Fisher Genome Biology* 2013, 14:204)

A particularly striking example is the identification of mutations in the gene FOXP2, which lead to a severe speech and language disorder - developmental verbal dyspraxia - in carriers of one affected allele.

In the past 15 years, extensive research has been conducted by multiple research groups on the molecular effects of FOXP2 mutations. FOXP2 is known as a transcription factor, a class of proteins which regulate transcription of RNA from DNA. Evidence for interaction of FOXP2 with multiple genes important for normal brain function has been established. For a comprehensive review of the role of FOXP2 in the brain see e.g. FOXP2 as a molecular window into speech and language. *Trends in Genetics* 2009 4:166-177 and: What can mice tell us about Foxp2 function? *Current Opinion in Neurobiology* 2014, 28:72–79. In summary, the transcription factor FOXP2 is implicated in multiple processes relevant for proper brain function, such as neuron outgrowth and establishment of proper connectivity. The FOXP2 as a molecular window into speech and language review focuses on FOXP2 in humans, its history, interactions with other proteins and evidence from molecular and behavioural science on FOXP2. The what can mice tell us about Foxp2 function?, review focuses on Foxp2 in mouse and what mouse models for FOXP2 can teach us about language. This more recent paper highlights the recent molecular, cellular and behavioural evidence for Foxp2 on a single mouse model, but expands on this knowledge and explains the construct validity of the mouse as a model for Foxp2.

Additionally, it has been shown that FOXP2 is very well conserved throughout the animal kingdom with homologs of the human FOXP2 gene found in fruitflies, fish, birds, rodents, bats and large primates, lending construct validity to our mouse studies. This conservation is very well described in: The eloquent ape: genes, brains and the evolution of language, Nature Reviews Genetics 2006, 1:9-20. The co-applicant's group ([REDACTED] [REDACTED]) has enabled production and maintenance of several genetically modified mouse lines with mutations mirroring those found in monogenic speech disorders in humans. The goals and aims in this project proposal are supported by multiple grants and funding agencies on both a national and international level. These include departmental funding from the [REDACTED] Gesellschaft, funding from the [REDACTED] and multiple Marie Curie career integration grants. The mouse lines have previously been used to investigate gene-networks affected by Foxp2 mutations as well as the spatiotemporal expression pattern of Foxp2 in the brain. These results have opened up a very interesting entry point to study how Foxp2 affects the brain and will also enable us to advance our investigations into different monogenic disorders in which speech and language are affected. Thus, this project aims to combine the genetic expertise of [REDACTED] with the interests of the [REDACTED] of the [REDACTED]. Utilizing our combined experience, we will be able to design the best possible experiments in order to answer how mutations in language-related genes affect the brain on different levels.

Previous research (Foxp2 Regulates Gene Networks Implicated in Neurite Outgrowth in the Developing Brain, PLoS genetics 2011, 7:e1002145) has shown intriguing evidence on both the genetic and functional level implicating Foxp2 in neuronal outgrowth and development. Very recently, another role for Foxp2 in the regulation of retinoic acid receptors has been found by the same group, implicating Foxp2 in regulation of cellular activity as well (FOXP2 drives neuronal differentiation by interacting with retinoic acid signaling pathways , Frontiers in cellular neuroscience 2014, 8:305:1-13). We want to further investigate these roles of Foxp2 and also extrapolate to other monogenic disorders with a speech and language phenotype. From these previous results, we have generated the hypothesis that Foxp2 mutation and other disorders affecting speech and language affect specific cell types and brain regions. Specifically, cells present in brain regions involved in motor coordination such as cortex, striatum, thalamus and cerebellum (Characterization of Foxp2 and Foxp1 mRNA and protein in the developing and mature brain, The journal of comparative neurology 2003, 2:266-279). Preliminary results of our lab have shown that a specific cell population (Dopamine-1 receptor expressing cells) in the mouse striatum is specifically affected when functional Foxp2 is decreased or removed. Our goal is to find the mechanistic links between the gene defect and behavioural phenotype. To this end, we will need to investigate different aspects of motor network function: The molecular, cellular, physiological and behavioural levels.

Proper connectivity within and between brain structures during development is essential for correct brain function, especially for complex behaviors such as speech production and language. A recent review (Cortico-striatal connectivity and its role in disease, Nature Reviews Neuroscience 2013, 4:278-291) very elegantly explains that defects in specific cell populations along the brain's motor circuits are a common cause of motor disorders. In addition, the importance of proper brain wiring for movement is described, which is in turn essential for the acquisition of motor control over facial muscles necessary to produce functional language.

By using mouse models for genes implicated in the development of speech, we can elucidate the effects these genes have onto the brain in exquisite detail. Specifically, mouse models allow close investigation of the development and function of the brain. Previous molecular research conducted in the MPI language and genetics department has shown that mutations found in FOXP2 affect the proper development of cultured mouse neurons and neuron-like cell lines. As explained before, we have ample experience with multiple mouse lines implicated in speech and language disorders. Research utilizing these models enables us to understand how gene mutations affect the individual. Effects can range from molecular mechanisms to

behavioral effects, and we propose to study those in the experimental paradigms outlined here. We utilize different approaches and experimental techniques to investigate how the brain's capacity to execute complex tasks such as complex motor sequences is established, and how disorder-causing mutations affect the brain.

Another aspect which has not yet been investigated is the potential for rescue of the phenotype shown in our mouse models. We have developed the hypothesis that the motor learning deficits we observe in our mouse models are caused, for the most part, by defects in specific cell populations in the brain's motor circuits. Thus, we plan to ultimately use advanced methods such as targeted optogenetics to adjust the activity of those cell populations, thereby remedying the motor learning phenotype. This will further our understanding of the necessity of Foxp2 and how possible treatment options can be established for people suffering from similar speech and language problems.

In addition to these new directions in Foxp2 specific research, we would like to extend our research aims to other genes implicated in speech and language disorders. Research towards discovering new genes is still ongoing, but first candidate genes for our research are genes such as Foxp1, Tbr1 and Cntnap2, which are all implicated in different cognitive deficits with a prominent language phenotype.

FoxP1 is another member of the forkhead box group of proteins to which FoxP2 also belongs. These proteins all share the same characteristics, being DNA binding transcription factors. Interestingly, FoxP1 knockout mice are embryonal lethal, indicating FoxP1 as a very important gene during development. Mice with a (tissue specific) conditional knockout of FoxP1 later in development show behavioral problems similar to FoxP2 in several aspects, as well as morphological changes in brain regions where FoxP2 is highly expressed. The possible functional significance of FoxP1 and the relevance of investigating FoxP1 malfunction in the light of FoxP2 research is well described in: Brain-specific Foxp1 deletion impairs neuronal development, 2015, Molecular Psychiatry 49:632-639.

Tbr1 is another transcription factor expressed in the brain and known to be important during brain development. Mutations in Tbr1 lead to autism like social behavior in humans and mice. Additionally, in mice a negative impact on ultrasonic vocalizations has been reported. Moreover, it has been shown to interact strongly with FoxP2 in vitro, as investigated by the co-applicant's group at the MPI. The impact mutations in either FoxP2 or Tbr1 on this interaction is very well explained in: De novo TBR1 mutations in sporadic autism disrupt protein functions, 2014, Nature Communications, 5:4954

Cntnap2 is a gene in which mutations can lead to many language-related phenotypes. It has been implicated in autism and schizophrenia, but also dyslexia and other language disorders. Thus, Cntnap2 mutations can lead to phenotypes related to language disorders, validating our interest in this gene. Additionally, Cntnap2 interacts with FoxP2 as well, as FoxP2 can bind to intron 1 of Cntnap2 and regulate its expression. The genetic evidence for Cntnap2 mutations and possible interactions with FoxP2 has been shown in research conducted by the co-applicant's group at the MPI. This research is shown in: Shining a light on CNTNAP2: complex functions to complex disorders, 2014, European Journal Of Human Genetics, 22:171-178

We conclude that these three genes are interesting because of two main features: First, data from human patients indicates that mutations in these genes lead to disorders with a similar phenotype as mutations in FoxP2 (language related). Second, there is convincing in vitro evidence for functional interaction between these genes and FoxP2. Any other gene that we could become interested in will need to confirm to these guidelines in order to be considered for further investigations in mice.

We will investigate mutations in these genes using genetically modified mouse models that mirror the genotype found in affected humans. We expect our initial results to show specific brain regions or cells to be affected. This will enable us to use transgenic strategies to create modifications to specific these regions (e.g. Cre-mediated cortex-specific transgenes) or cell populations (e.g. Dopamine-D1 receptor expressing neurons).

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?
-

Combining the expertise of [REDACTED] I as well as the [REDACTED] [REDACTED] we will be able to investigate the proposed research directions in a multidisciplinary manner using state-of-the-art techniques. Furthermore, the facilities required to conduct our research, [REDACTED] [REDACTED] in Nijmegen at the animal facility (Centraal Dierenlaboratorium, CDL) of the Radboudumc. In addition, the [REDACTED] group's state-of-the-art electrophysiology laboratory will allow very detailed investigations of the cellular and physiological properties at the single-cell level. In summary, this research plan aims to investigate the effect of mutations in language-related genes on a molecular, cellular, neurophysiological and behavioral level. This will enable us to devise a new approach for identification, investigation and possible remediation of disorders affecting motor regions governing speech and language tasks.

3.3 Relevance

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

Increased knowledge regarding the influence of genetic mutations related to speech and language on the brain is necessary to further our understanding of speech related disorders, which have a very large societal impact. However, there are specific disciplines within neuroscientific research, especially on the synaptic and circuitry level, which have only sparsely been explored regarding speech and language disorders. Our previous collaborative efforts have shown tentative evidence for the effect of Foxp2 on a circuitry level in specific brain areas. We want to continue our investigation of these defined brain regions, especially during developmentally relevant time periods, using new techniques to study how connections within and between brain regions are affected. We aim to investigate the impact of mutations in Foxp2, and the genes that interact with it, on neuronal function in working mouse brains. We will specifically focus on brain regions shown to be affected by FOXP2 mutations in humans. This will enable us to extend the rich body of previous and ongoing molecular work in cell models into brain circuitry and function, and thus fill specific gaps in our knowledge with regard to speech and language disorders. Overall, we are convinced that this research will increase our knowledge with regard to speech and language disorders. We will be able to increase knowledge on the specific brain areas, cell populations and genetic mechanisms that are affected by mutations in language-related genes. These mutations have a large impact on the overall function and wellbeing of affected persons, as speech and language impairments greatly impact everyday life. Better characterization and understanding of these disorders will result in a mechanistic characterization of a common neural pathways underlying different monogenetic speech disorders. This will be the first time such a pathway has been completely characterized on all levels from genetic disorder to motor phenotype. Combining the existing knowledge in our groups on both genetics and cellular physiology, we will be able to unravel specific cellular deficits for genetic mutations related to speech and language disorders. Using the knowledge gained during this 5 year project, we will be able to explain motor deficits affecting speech production from a cellular, developmental and circuit perspective. This is not necessarily limited to language disorders, as the investigated brain regions govern other motor

tasks as well. Exact knowledge of the proteins, cells, and brain circuitries affected in language-related disorders will enable a much more detailed diagnosis and development of circuitry-level based therapeutic interventions.

3.4 Research Strategy

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

Previous research has uncovered possible interactions between language related genes, most notably *Foxp2*, and other genes. For example, [REDACTED] group (Vernes et al. 2011) reported on the interaction between *Foxp2* and a large number of genes important for neurogenesis, neuronal outgrowth and synaptic activity. This research was done both in cell models and primary neural cultures of *Foxp2* mouse models, and strongly implicated *Foxp2* function in neuron-related gene networks.

Primary neuronal cultures, which form an integral part of our research, enable us to study connectivity in a very controlled environment. Neurons function normally and we can use these primary cultures to measure many different cellular properties and cell specific effects. However, these cultures do not conserve the circuitry normally found in the brain, especially complicated networks such as cortical layering or projections to different brain regions. Thus, in addition to using our established primary culture protocol, we aim to investigate network properties of intact mouse brains as well.

Using a multitude of experimental techniques, we aim to investigate the influence of language-associated genes on brain development and function on several levels: Molecular, cellular, physiological, and behavioural.

- **Molecular:** Currently, *Foxp2* is the gene with the strongest link to language phenotype. Tentative evidence has been found linking other genes to language related phenotypes as well, and we would like to include these and any other newly discovered genes as possible genes of interest in this research proposal. *Foxp2* is a transcription factor, which are genes that can activate or suppress the expression of other genes and thus act as "switches" in the genetic programming of cells. The actual effects on the neurons expressing those genes are thus likely to be indirect. Gene networks have implicated *Foxp2* in neurite outgrowth, which was corroborated in subsequent *in vitro* experiments in primary neuronal cultures. Continuing those with more detail still forms an important part of our project.

However, while cell cultures are well-suited to investigate the molecular effects on single cells, these *in vitro* methods are not well-suited to study the intricate, interconnected mechanisms at work in the developing brain. Therefore, the developmental aspects many of the possible effects of *Foxp2* mutations, especially on neurogenesis and neuronal localization, need to be validated *ex vivo* in brain slices. This research objective will be achieved by stainings *ex vivo* preparations of transgenic mouse brains with *in-situ* hybridizations (ISH, for gene expression) and immunohistochemistry (IHC, for protein levels). Using *in-situ* hybridizations will enable us to investigate gene expression on the brain-region and cellular scale: Confirm the presence of mRNA for *Foxp2* and other language-related genes in different brain regions and stages of neuronal development, from mid-gestational embryonal stages to early postnatal stages. This technique is especially well-suited because it allows precise quantification of mRNA production, and thus gives a measure of gene activation in the context of the developing brain.

Additional steps of regulation happen in the *translation*, the production of proteins from mRNA. Therefore, in order to localize and quantify the final activity of our genes of interest, we also need to measure the amount of proteins that are produced. This research objective is best achieved by immunostainings, which allow to precisely measure and localize protein expression in the tissue of interest. Using this method we can investigate the impact of mutations in language-related genes on translation from mRNA into functional protein. Furthermore, combining the outcomes of cell cultures, ISH and IHC enables us to precisely quantify regulation of gene activity by our genes of interest at all relevant levels. These outcome

measures together will enable us to form a strong hypothesis on the impact mutations in language-related genes have on mRNA and protein levels of Foxp2 in different brain regions during development.

- Cellular: It is a well-established paradigm that numerous genes are expressed in specific cell populations in the brain, at specific developmental timepoints. This is the case for Foxp2 as well, whose temporal and spatial expression pattern is deemed crucial for proper brain function. However, the exact mechanisms affected by mutations in Foxp2, and other genes which affect speech and language are not well characterized during development. This aim focuses on cellular characterization during development, especially regarding network establishment (anatomical connectivity), and network function (synaptic connectivity). Foxp2 has already shown to be important for establishment of proper cellular growth in primary cultures; However, the developmental profile still remains to be assessed in detail. For other language-related genetic mutations, we would like to be able to continue our investigation after initial validation in primary cultures as well.

To assess the importance of transcription factors such as Foxp2 during development, we aim to extract genetically modified and wild-type embryos at mid-to-late gestational stages, when the relevant brain development takes place. We will focus on processes such as neurogenesis, neuronal migration, neurite growth, network establishment and pruning. Effects on these processes will be investigated by comparing expression levels of relevant genes by staining (ISH and IHC).

Since different neuronal populations are generated at different developmental time points (e.g. in the generation of the cortex), neurons can be "birthdated" by injection of a labelling substance for specific neuron types (e.g. BrdU) during embryonal development. In order to investigate network establishment, we aim to trace connections between brain regions using *in vivo* injections of anatomical tracers into the brains of adolescent / adult animals. Tracers are substances that label neurons around the injection site, visualizing the up- and downstream projection targets of those neurons. This will enable us to investigate the effects of Foxp2 on network establishment and function during later stages of development as well as during adult life as functional Foxp2 expression is present during adolescence and adulthood as well. We aim to enable the investigation the effect of language-related genes' effect on cell morphology and connections to other cells. This cannot be done by visualizing Foxp2 mRNA or protein, as these outcome parameters do not give us information about the intercellular effects of mutations in language-related genes. Visualizing the connections cells make when Foxp2 is mutated, and comparing these connections to connections in wildtype cells, will give us detailed information about the effect Foxp2 has on the establishment of proper connections in the brain. By establishing which connections in the brain are affected by mutations in language-related genes will give insights into the circuit-level defects that underlie the actual physiological and behavioural dysfunctions that characterize language disorders.

- Physiology:

With cellular and molecular research, we can identify and characterize the cell types and brain regions of importance on a genetic, morphological and anatomical level. This does however not explain how these changes affect cells on the functional level. In order to investigate this we will need to investigate cellular activity in a system where these cells are still functioning as they would in the living animals. To this end, electrophysiological measurements on acute *ex vivo* brain slice preparations are ideally suited: They allow for high-throughput measurements in a well-controlled environment while reducing the discomfort for the animals to a short anesthesia and euthanasia step. We aim to use electrophysiology on acute brain slices to answer how these genetic, morphological and anatomical changes affect cellular activity. When processed quickly, *ex vivo* preparations of brain slices retain viable neurons for the next 8-12 hours, allowing detailed investigations of the neuron's electrophysiological properties. [REDACTED] has ample experience with electrophysiological measurements on the single cell (patch clamping) as well as multi-cell (multi-electrode array) level.

Using these experimental tools has given us initial insight into the effect of Foxp2 mutation on cell populations in the cortex and striatum during development. However, we would like to extend our research to other brain networks in addition to the striatum. Lastly, this experimental paradigm can be extended to investigating the effect of newly established language associated genes on cellular activity.

- Behaviour/Rescue: Lastly, we would like to be able to translate our findings back to known behavioural phenotypes. Using our results from the previously described research lines, we can investigate in depth the effects of the mutations on behaviour. Previous research on the effect of Foxp2 mutation on motor performance has been on animals where Foxp2 is decreased in all cells and tissues. These paradigms can be vastly improved by having brain region- or even cell-type specific knockout mouse models for the relevant genes, which we propose to introduce into these experiments. Additionally, our mechanistic hypotheses can be directly proven by rescue experiments. The first gene specifically related to language, Foxp2, was first identified in humans showing a facial musculature specific motor deficit. Therefore, specific motor tasks are an appropriate tool to assess the effect of mutations in Foxp2 and other language-related genes in mouse models. Previous behavioural research on Foxp2 mutant mice, for example, showed an effect on motor coordination: In their 2008 article, Groszer et al. report impaired rotarod performance in Foxp2 mutant mice. We aim to test the hypotheses generated by the previously mentioned objectives in an *in vivo* mouse model, using behavioural assays such as the accelerating rotarod. Animals are placed on a rotating beam on which they need to walk to prevent falling off. The time it takes for an animal to fall, as well as the speed with which an animal learns the task, can be used as measures for motor coordination and motor learning.

By manipulating cell populations with spatially or genetically targeted manipulations, for example targeting optogenetic receptors to specific subpopulations in the motor circuitry, we aim to prove the functional relevance of the targeted cell populations for the behavioural phenotype.

Coherence: Our experimental procedures are set up to follow each other logically. For example, results from e.g. molecular research (primary neuronal cultures) are necessary for us to form a correct experimental hypothesis regarding the cellular research (electrophysiology). Molecular research will be used to identify targets for cellular research. Defined cell populations can then be investigated using cellular techniques and electrophysiological tools. Finally, our behaviour and rescue experiments will depend on the cellular mechanisms found to be affected by mutation. This approach will be used several times over the course of the experiment to address different aspects of language-related gene function. As stated before, a large part of our research until now has focused on global Foxp2 mutation. We will extend this to mutation of Foxp2 in specific brain regions or cell populations to investigate the relative importance of Foxp2 in different parts of the brain's motor circuitry. Furthermore, we plan to apply the same analysis pipeline to mouse models of other candidate genes for language-related deficits. This combinatorial approach will serve to elucidate whether the different genetic mutations cause convergent defects in the brain's motor circuitry.

Go/no go moments: Between each part of our experimental protocol, we can assess the viability of continuation or the necessity to readdress our research strategy. This is especially relevant for designing new experiments which follow from previous results. For example, results obtained using primary neuronal cell cultures will aid in deciding on the appropriate electrophysiological experiments. In turn, if the electrophysiological experiments confirm the phenotype found in neuronal culture assays, the affected brain region will be assessed in tracing and behavioural experiments. Next to designing new experiments, we need to assess the viability of the project when we will investigate newly found genetic mutations. Depending on the time left for the project upon discovery and implementation, a go/no go decision can be made to run a full / part of / no experimental procedure for this genetic mutation.

Lastly, we will regularly discuss the viability of each aspect of the project. As we have four experimental paradigms we will employ we will need to assess each separately as well as in light of the essential aim of the project. If we decide a certain paradigm is no longer suited or needed for us to reach our conclusions we will be able to be more efficient with regard to our experimental procedures.

Timeline: Our project proposal has different aspects which are interdependent. From the moment the license is approved until the end of the project animals will be kept in breeding. The research on two Foxp2 mutations (R552H and S321X) is already in a more advanced stage, and therefore substance administration and behavioural testing with animals affected by these mutations will already happen during the first 2 years of this project (see timeline). However, this project is not limited to Foxp2, and recently discovered language-related genes (e.g. Tbr1 or Cntnap2) will be investigated using the same experimental procedures. A full investigation will take approximately 2,5-3 years from the start of the project (see timeline), and therefore the final addition of new genetic lines to this project application could happen around 01-2018. This strategy is outlined in two tables. The first table gives an overview of specific timepoints when new investigations can be started, especially for behaviour. The second table

shows a detailed outline from start to finish for an example gene, going from the first characterization (after in vitro assessment) to the final experiments for one specific mutation.

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 experimental components mentioned above are going to be realised in several different animal procedures, as described in the following appendices:

- **Stock breeding without discomfort and organ extraction (Appendix 1):** Breeding and maintenance of all animal strains that do not suffer discomfort as a result of their genetic condition. Animals may be euthanized at defined timepoints for organ harvesting, typically the brain or embryos of a defined developmental stage. Alternatively, they may be transferred to separate experiments for substance administration (Appendix 3, see below) or behavioural testing (Appendix 4, see below).

- **Breeding with discomfort and organ extraction (Appendix 2):** This is a separate breeding procedure to accommodate breedings with a risk of discomfort due to the genetic condition. At the moment, this is only the case for heterozygote - heterozygote crossings of our *Foxp2*-mutant lines: Around 25% of the offspring, namely homozygous mutant animals, are going to experience moderate distress throughout their life and usually die around postnatal day 30. Animals may be euthanized for brain harvesting, or transferred to separate experiments for substance administration (Appendix 3, see below) or behavioural testing (Appendix 4, see below). When we acquire new animal strains, we will discuss with the IvD if animals should be allocated to breeding with or without discomfort depending on the genotype.

The large majority of experiments will be done with *ex vivo* brain / embryonic brain preparations, which means that almost all animals are only going to experience mild, momentary discomfort from timed breedings and euthanasia. Only a very small portion of animals will experience additional discomfort due to the experiments, as outlined below.

- **Substance Administration and organ extraction (Appendix 3):** Animals will receive either globally acting substances, or specific targeted injections. Examples of globally acting substances include inhibiting peptides, psychoactive drugs, or labelling substances for "birthdating" newly generated neurons. These substances can be administered via injection or oral gavage. This approach is the preferred administration approach, and is essential to investigate the effect of genetic mutations on brain development and neuron localization.

Alternatively, animals receive targeted injections of locally-acting substances at stereotactically defined locations in the brain. Examples include viral vectors to drive gene expression, or tracers to visualize neuronal connections. This approach requires a survival surgery, during which the injection is placed through a small craniotomy. Contrary to the globally-acting administrations described above, this approach allows the specific modification of narrowly defined cell populations or brain regions, allowing us to verify and extend previous findings from single-cell electrophysiology in *ex vivo* brain slices.

In both cases, the animal will need to survive for up to 3 weeks after the end of the treatment to allow for the effects to fully develop. Subsequently,

the animals will be either euthanized and their brains harvested, or transferred to behavioural testing (Appendix 4, see below) to assess the effect of the manipulation.

Both administration methods will be used in multiple ways, either to visualize cellular properties, or to perform rescue experiments. These rescue experiments are based on previous data implicating certain cellular mechanisms in the genesis of the mutant phenotype. Targeted interference to restore circuit functions to wildtype levels is considered the final proof that the system at hand has been understood sufficiently well, and also lends additional translational value to future applications in the clinic.

- Behavioural testing (Appendix 4): Animals will be tested on their motor learning skills and cognitive function. The experiments form a crucial translational link between our genetic and cellular evidence and a behavioural phenotype. In addition, these behavioural paradigms are well-suited to assess rescue experiments: They provide an insight into the degree of influence specific interventions can have towards restoring performance back to wild-type levels.

Here you will find an extended table describing each suggested animal procedure and the animal numbers we have calculated as necessary to properly investigate our experimental research questions.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The described components all serve the goal stated above, namely to unravel the specific mechanisms of action for genes found in human speech and language disorders. In essence, the gene mutation (genotype) and human speech disorder (phenotype) are known, and we strive to find the specific mechanisms that act in between. To this end, we need to know the mechanisms acting on the molecular, cellular, network and behavioural level. We will use genetically modified mice to investigate effects of specific genes in all these research areas. Results obtained from experiments on one level of complexity (i.e. cellular) will help to form hypotheses in the others (i.e. behavioural). There is sufficient previous research to allow testable hypotheses with regard to each part of this project license. Thus, we are convinced that this project is coherent and focused enough to warrant a project license.

Lastly, we are confident we will be able to utilize the 5 years given in this project license to design and perform experiments aimed to localize, characterize and rescue deficits in the neural motor pathway caused by genes shown to be involved in speech and language development.

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	Stock breeding without discomfort and organ extraction
2	Breeding with discomfort and organ extraction
3	Substance administration and organ extraction
4	Behavioral testing and organ extraction



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Stock breeding without discomfort and organ extraction</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Stock breeding without discomfort and organ extraction
Serial number	Type of animal procedure					
1	Stock breeding without discomfort and organ extraction					

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.

Primary goal:

The primary goal of this research project is to unravel the function of language-related genes in the motor system of the mammalian brain. We aim to investigate the function of those genes on the molecular, cellular, physiological and behavioural level. The first three aspects (molecular, cellular and physiological) will mainly be addressed by using *ex vivo* preparations of brain tissue from genetically modified mice at embryonal, adolescent and adult life stages.

General Design:

The aim of this animal procedure is to breed and maintain sufficient numbers of mice genetically modified to have specific defects in language-related genes such as *Foxp2*. A small part of the resulting mice will be used in substance administration (Appendix 3) and behavioural experiments (Appendix 4). Furthermore, it covers the extraction of brains for *ex vivo* experiments: Generally, animals will be bred and maintained to experimentally appropriate timepoints, then anesthetized and sacrificed for the extraction of organs, typically the brain and/or embryos. This procedure ensures minimal discomfort for the animals, while allowing extended studies on the *ex vivo* preparations.

Ex vivo preparations are ideally suited to investigate the molecular, cellular and physiological aspects of language-related gene function, because the preparations allow for a much better control of environmental parameters than would be possible *in vivo*. In addition, using embryonal brains as a source of primary neurons for cell cultures allows studying the molecular and cellular properties with excellent specificity, while greatly reducing the amount of animals required: Brain preparations from one litter of embryos results in millions of cells that can be cultured and studied in great detail in experiments lasting up to several weeks.

This procedure covers the animals suffering no discomfort from their genetic modifications. Most of the strains we currently use under multiple research projects do breed and develop normally. Breedings with strains that could, for a portion of their offspring, lead to discomfort, are outlined in a separate appendix (see Appendix 2 "Breeding with discomfort"). However, the large majority of breedings is going to be discomfort-free, and therefore covered by this appendix.

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

Animals will be group housed and mated according to well established housing procedures for animal breeding. To achieve the best possible protection from contamination, the animals will be kept in a barrier environment such as individually ventilated cages (IVCs), fed sterilized chow food, and only handled under a flow hood.

Animals will be genotyped at the appropriate postnatal age, via minimally invasive techniques such as ear biopsies, which induce only momentary discomfort. This technique has the additional advantage of allowing individual recognition of the animals.

Depending on the experimental setup, the animals will be used for substance administration experiments (covered in Appendix 3), behavioural testing (covered in Appendix 4), or organ extraction for *ex vivo* preparations (covered in this appendix).

Oestrus cycle measurement for timed mating (mild, 5 minutes, several times): In order to get precisely timed pregnancies for embryonal extraction at precisely defined timepoints, the oestrus cycle of the females destined for timed breedings will be monitored. After the timed mating, the cage will be visually inspected for the presence of a vaginal plug, since this indicates that a mating has actually taken place. The combination of the two procedures allows for very precise control of the mating timepoint. This, in turn, allows for precise timing of the embryonal age, which is crucial to the cortical development studies we plan to undertake. Depending on the breeding schedule, one or two females might be set with a single male. After the mating, the male will be removed from the cage and housed solitarily, because breeding males do tend to fight with when housed with other males after breeding.

Terminal anaesthesia, sacrifice and organ extraction (non-recovery, <1 minute, once)

a) Embryo extraction: The pregnant mothers will be anesthetized with an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. The embryos will be extracted to prepare *ex vivo* brain material for use in stainings, cell culture, or electrophysiological experiments. This procedure keeps discomfort to the pregnant mother to a minimum, and the use of embryonal brains (especially for primary neuronal cultures) allows us to make very efficient use of the sacrificed animals, as millions of cells can be extracted and cultured for *in vivo* experiments. To add additional use per sacrificed animal, we will consider in our experimental plans to concurrently extract the pregnant mother's brain along with the embryos.

b) Brain extraction at adolescent-adult timepoints: The animal will be anesthetized via an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. Subsequently, the brain will be quickly prepared out of the skull and immediately used for further experiments on the molecular and cellular levels. This approach ensures that the animals suffer as little discomfort as possible, while allowing us to measure gene expression in various parts of the brain's motor pathways. The use of *ex vivo* preparations allows for very precise localization and quantification of gene expression and circuit layout that would not be possible in any other way.

Special case electrophysiology: Transport to the lab (mild, 5 min, once), followed by terminal anaesthesia, decapitation and organ extraction (non-recovery, <1 minute, once): To fully understand the effects of language-related gene defects on the physiological level, i.e. the function of the brain's motor circuits, we aim to measure the electrophysiological properties of single cells and cell networks in acute brain slices of adolescent and adult mice. If done correctly, freshly extracted brain tissue can be cut into acute slices, in which most neurons keep living and functioning for up to 12 hours. During this time, the electrical activity of those neurons, and the networks they form, can then be probed in our specially equipped electrophysiology laboratory. The electrophysiological portion of the experiments necessitates transport of the live animal into our specially equipped electrophysiology laboratory, which is located in the same building complex as the CDL. The transport to our specially equipped electrophysiology lab is absolutely essential, since the technique requires immediate processing of the brain (< 1 minute after decapitation) in order to yield viable material. After processing, the tissue is extremely sensitive to movement, making any further transportation impractical. The animals will only experience mild discomfort during transport to the laboratory, which happens indoors and lasts for about 5 minutes. Once in the laboratory, they will be immediately anesthetized and decapitated, keeping discomfort to the animals to a minimum. This approach allows us to study the neurons in a well-controlled environment, and in much greater detail and with higher yield than would be possible *in vivo*.

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

For this breeding procedure, genetically modified mice of different strains will frequently be crossed with each other. Where necessary, we will breed

heterozygotes of the two strains with each other, and select the resulting offspring based on genotype. Alternatively, we will cross heterozygotes with wild-type mice.

The maintenance of the genetically modified lines for stock purposes will be kept to the necessary minimum, i.e. usually one breeding trio and their most recent offspring per strain. We strive to maximise utilisation of sacrificed animals: For example, when a timed-mated mother mouse is sacrificed for embryo extraction, the concurrent extraction of the mother's brain can provide an additional (adult) data point. To ensure compatibility and minimise backcrossing, mice will be maintained on a single genetic background (C57/BL6).

In order to estimate the animal numbers required for experiments, we will use the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05.

B. The animals

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

Species:

All experiments will be performed on genetically modified mice. Since the general goal of the project is to research the language-related gene *Foxp2* and its interaction partners, we plan to use:

- Mice with genetic modifications in the *Foxp2* gene
- Mice with genetic modifications in other *Foxp* family member genes
- Mice with genetic modifications in genes whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders
- Mice with genetic modifications to express transgenes such as LacZ, eGFP and Cre in a restricted manner: For example specific cell types or brain areas, or only at certain developmental timepoints.

Mice from those groups will frequently be intercrossed as experiments necessitate. Furthermore, the mouse is an ideal model organism for this type of research, because it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans, yet also uniquely amenable to genetic modifications. Mice share large genetic similarity with humans, and their brain's motor control circuitry has also been shown to be very similar. Taken together, these factors mean that mice are the model of choice for our project to completely characterize the influence of language-related gene defects from the molecular to the behavioural level.

Origin:

The mice will be sourced from recognized commercial breeders, collaborators (following quarantine), and own breeding stock already successfully established at the CDL in Nijmegen.

Estimated numbers:

From previous experience, and with an eye on the number of mouse strains we will have to maintain, we estimate to need 5680 animals for this procedure over the next five years, 43% of the project's total animal number of 13280. This is due to the fact that mice from this breeding procedure provide the majority of animals for tissue extractions for both embryonal and postnatal timepoints. It should be noted that none of the strains used in this appendix suffers discomfort related to their genotype.

In addition, a subgroup of the animals for the experiments described in Appendices 3 and 4 is going to be derived from the same stock as animals for this appendix (Appendix 3: 1360 animals, Appendix 4: 720 animals). Since these animals are merely going to be bred under Appendix 1, and experimentally manipulated under Appendices 3 and 4, they are not counted towards the total of this Appendix (App. 1), but rather under Appendices 3 and 4.

Life stages:

Breeding: Since this is a breeding procedure, the animals will be maintained as a breeding colony: Animals of the appropriate genotypes will be kept until adulthood, and used for breedings until max. 300 days of age. Animals destined for experiments will be used at experimentally relevant timepoints (postnatal day 8 – adulthood).

Embryo extraction: Embryos will be extracted from pregnant mothers (P 60-300) at mid-late gestational ages (E11-E19.5). Since our genes of interest likely serve as high-level regulators during brain development, we plan to assess brain development in our mouse models, which requires extraction of embryonic brains at mid-late gestational periods. Furthermore, the neurons of mid-late gestational embryos are exceptionally well suited for use in cell cultures, allowing for tightly controlled experiments with minimal animal usage.

Postnatal brain extractions: We chose adolescent and adult timepoints because they provide optimal insight into the clinically relevant states of the mutant brain: Adolescence in mice roughly maps onto the first postnatal years in humans, which allows detailed research into the initial set-up of the motor system that is crucial for language in humans. Measuring in adulthood, on the other hand, is crucial to investigate the long-term effects of language-related gene defects.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse (C57BL6J) with genetic modifications in the Foxp2 gene	Own breeding, collaborators	1900	Embryonal - Adult (P<300)
Mouse (C57BL6J) with genetic modifications whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders	Collaborators	1520	Embryonal - Adult (P<300)
Mouse (C57BL6J) with genetic modifications in other Foxp family member genes	Recognized breeders, collaborators	1900	Embryonal - Adult (P<300)
Mouse (C57BL6J) with genetic modifications to express transgenes (LacZ, eGFP, Cre)	Own breeding, Recognized breeders, Collaborators	360	Embryonal - Adult (P<300)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The experiments build on a large volume of research by the involved research groups, mainly in cell cultures. Those cell cultures include immortalized cell lines, such as HEK293 or SHS5Y5 cells, which do not require the sacrifice of animals at all, and primary neuronal cultures, which are a very efficient use of extracted embryonal neurons. Immortalized cell lines are well-suited to research into basic molecular and genetic effects of our genes of interest, but do not form any neuronal connections. Neuronal cultures form random connections while growing *in vitro*, and thus are well-suited to assess general synaptic phenotypes at the single-cell level. However, neuronal cultures are not as well-suited to model complex processes that involve multitudes of different cell types. Our research questions also concern complex, interdependent processes such as brain development, wiring, or circuit function, all of which also require studying intact mouse brains. Thus, the single-cell perspective we gain from cell cultures will form the basis on which we formulate our hypotheses to test on the circuit level in *ex vivo* brain preparations from mouse models.

Reduction:

- The animal strains will be carefully chosen with regards to the current needs of the experiments. For example, we reduce the variability in our samples by measuring with littermate controls wherever possible. This allows us to reach stronger effect sizes with smaller groups of animals due to the lowered variability.

-Furthermore, the use of primary neuronal cultures from embryonic neurons greatly reduces the number of animals required to answer questions on the molecular and cellular aspects of our study: Brains from one litter of embryos allow for the extraction of millions of primary neurons, which can be cultured and serve for the basis of multiple *in vitro* experiments lasting several weeks.

Refinement:

-To guarantee the best possible environment and minimize chances of contamination for the animals, they will be housed in sterilized individually ventilated cages (IVCs), receive sterilized food and drinking water, and only be handled under a flow hood. This housing regime is considerably more sophisticated than the filter top cages commonly used for similar experiments, and adds additional layers of isolation from potentially interfering outside influences, such as viral infections.

- In addition, the use of anaesthesia in all terminal procedures actively minimizes animal discomfort. The use of the volatile anaesthetic isoflurane before electrophysiology experiments additionally ensures that the resulting brain slices, in which neurons live and function for several hours after preparation, are not influenced by anaesthetics residues.

- The timed breeding required for embryonal timepoints will be done only after ensuring optimal fertility (via oestrus cycle measurement) and checking for mating afterwards (via vaginal plug inspection), thus ensuring that the animals are only bred when chances of conception are optimal.
- The intercrossing of "marker" lines expressing fluorescent proteins in specific neuronal subpopulations in the brain will allow direct identification of experimentally relevant cell populations in e.g. electrophysiological experiments. This adds an additional level of detail to our research (cell population-specificity instead of brain region-specificity), without any additional discomfort to the animal. Leading theories in the field are proposing the clinical relevance of neuronal subpopulation-specific dysfunction, which makes this labelling approach all the more relevant.

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

1) Animals will be kept in a strictly isolated environment (IVCs, see above) to minimise chances of contamination. Furthermore, this procedure describes breedings only of lines with overtly normal phenotypes, i.e. that do not suffer from their genetic modifications. Animals will be monitored at least weekly, and any animal showing signs of any distress will be processed according to the humane endpoints outlined in section J.

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?

We do not expect any adverse effects from the genotypes or housing, since the mice develop and breed normal and live without overt signs of discomfort. Nevertheless, animals will be closely monitored to detect any sign of undue distress.

Explain why these effects may emerge.

Despite the best countermeasures, some animals might develop illnesses, or experience social stress due to fighting among cagemates.

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

If the animal shows bodily or behavioural symptoms indicating undue distress, it will be euthanized according to the humane endpoints outlined below.

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.

Despite the best countermeasures, animals might sometimes show signs of undue distress. Outward signs such as a ruffled fur coat or wounds, and behavioural signs such as limping, hunched back, or immobility will be taken as sign for undue distress, and the animal will be sedated and euthanized immediately.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is very low, since the mouse strains are overtly normal in health and behaviour, and are housed in specially isolated individually ventilated cages, reducing outside exposure.

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).

Marking / tissue sampling for genotyping (mild, once, 100% of all animals): After the first postnatal week, the animals will be marked by an appropriate method such as ear biopsies, which induce only momentary discomfort. The resulting samples will be used for genotyping. In rare instances, due to technical failures in genotyping, a second sample may need to be taken.

Timed breedings (mild, few minutes, several times; 1600 females, 28% of totally 5680 animals for this Appendix): Precise timing of conceptions in timed breedings will be ensured, where necessary, by appropriate methods such as oestrus cycle measurement.

Euthanasia and organ extraction: The animals are going to be euthanized in one of the two following ways:

In case of electrophysiology: Transport to the lab (mild, 5 minutes, once; 2800 animals, 49% of totally 5680 for this Appendix). On the day of the experiment, animals will be placed in cardboard boxes with bedding material provided by the CDL staff. They will be quickly transported to our specially equipped electrophysiology lab in the Radboudumc, which is within the same building complex as the animal laboratory. The only discomfort the animals are going to experience during this time is movement and unfamiliar surroundings. Once in the laboratory, the animal will directly be euthanized and have their brains extracted as outlined below.

Euthanasia for tissue extraction (non-recovery, <1 minute, once; 2880 animals, 51% of totally 5680 animals for this appendix. Of these, the 1600 animals that are used for embryo extraction have undergone timed breeding procedures as described above): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as isoflurane (in case of electrophysiology) or pentobarbital (for all other applications), and the absence of pain reception will be tested via e.g. forepaw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation). Animals will be killed via cervical dislocation, decapitation, or transcardial perfusion, as the experiment necessitates. Typically, the brain will be extracted. In some cases, the brain will be extracted along with embryos of a defined developmental age.

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.

If the animals are not going to be used in other procedures first, they will be either maintained for stock breeding purposes or sacrificed for tissue extraction. The latter entails extracting brains from postnatal animals (adolescence – adulthood) for various measurement methods such as electrophysiology or stainings. Additionally, developmental aspects will be studied mainly in embryos of mid-late embryonal stage, which requires sacrifice of the pregnant mother. Extracted embryos will be used directly in experiments (e.g. stainings), or as a source of primary neurons for cell culture.

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.
- 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>Breeding with discomfort and organ extraction</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Breeding with discomfort and organ extraction
Serial number	Type of animal procedure					
2	Breeding with discomfort and organ extraction					

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.

Primary goal:

The primary goal of this research project is to unravel the function of language-related genes in the motor system of the mammalian brain. We aim to investigate the function of those genes on the molecular, cellular, physiological and behavioural level. The first three aspects (molecular, cellular and physiological) will mainly be addressed by using *ex vivo* preparations of brain tissue from genetically modified mice at embryonal, adolescent and adult life stages.

General Design:

The aim of this procedure is to breed sufficient numbers of mice for planned experiments on the molecular, cellular, physiological and behavioural levels. This animal procedure covers a part of the breedings for experiments in all four aspects, namely breeding of animals with a chance of discomfort from their genetic modifications. The large majority of the animals is going to be used directly in experiments for *ex vivo* preparations at embryonal, adolescent and (in case of heterozygotes and wild-type mice) adult timepoints. A small minority will be used in substance administration (Appendix 3) and behavioural (Appendix 4) experiments. Currently, the only animals with a chance of genotype-related discomfort are homozygous offspring of heterozygote - heterozygote crossings for two of our mutant mouse lines: *Foxp2-R552H* and *Foxp2-S321X* mutants. Additional transgenes might be bred into the line if they provide no additional discomfort (e.g. GFP-expression constructs that visualize a subpopulation of neurons without further interfering with brain function). Thus, even though all heterozygote - heterozygote breedings of all *Foxp2*-mutant strains will be registered under this appendix, only 25% of the registered animals (homozygous mutant offspring) will actually experience discomfort. Those homozygote mutants experience reduced growth, impaired motor coordination, periods of akinesia, and die before reaching reproductive age. Thus, the homozygote mutants will not be kept for stock breeding, but rather be used in experiments or (in the rare case they are not used in experiments) get euthanized before P30 (see section J, Humane Endpoints). Since the homozygous *Foxp2*-mutant mice represent the strongest phenotype, they are crucial to some of our experimental outcomes, as the stronger phenotype allows us to find differences in a small number of animals that might otherwise only be detected with many more heterozygous animals. Furthermore, a large part of the research will be primary neuron cultures, which means that most heterozygous mutants will already be extracted at embryonal timepoints, and consequentially not suffer any discomfort.

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

Animals will be group housed and mated according well established experimental housing procedures for animal breeding. To achieve the best protection from possible contamination, the animals will be kept in a barrier environment such as individually ventilated cages (IVCs), fed sterilized chow food, and only handled under a flow hood.

Since this appendix specifically considers the breeding of animals with discomfort, appropriate additional measures will be taken to minimise the discomfort of those animals. For example, the only genotypes that currently would fall under this appendix have reduced movement coordination and stunted growth, and thus will receive food in mashed form and water in gel form if they struggle to reach the food hopper.

Animals will be genotyped at the appropriate postnatal age, via minimally invasive techniques such as ear biopsies, which induce only momentary discomfort. This technique has the additional advantage of allowing individual recognition of the animals.

Oestrus cycle measurement for timed mating (mild, 5 minutes, several times): In order to get precisely timed pregnancies for embryonal extraction at precisely defined timepoints, the oestrus cycle of the females destined for timed breedings will be monitored. After the timed mating, the cage will be visually inspected for the presence of a vaginal plug, since this indicates that a mating has actually taken place. The combination of the two procedures allows for very precise control of the mating timepoint. This, in turn, allows for precise timing of the embryonal age, which is crucial to the cortical development studies we plan to undertake. Depending on the breeding schedule, one or two females might be set with a single male. After the mating, the male will be removed from the cage and housed solitarily, because breeding males do tend to fight with when housed with other males after breeding.

Depending on the experimental setup, the animals will be used for substance administration experiments (covered in Appendix 3), behavioural testing (covered in Appendix 4), or organ extraction for *ex vivo* preparations (covered in this appendix).

Terminal anaesthesia, sacrifice and organ extraction (non-recovery, <1 minute, once)

a) Embryo extraction: The pregnant mothers will be anesthetized with an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. The embryos will be extracted to prepare *ex vivo* brain material for use in stainings, cell culture, or electrophysiological experiments. This procedure keeps discomfort to the pregnant mother to a minimum, and the use of embryonal brains (especially for primary neuronal cultures) allows us to make very efficient use of the sacrificed animals, as millions of cells can be extracted and cultured for *in vivo* experiments. To add additional use per sacrificed animal, we will consider in our experimental plans to concurrently extract the pregnant mother's brain along with the embryos.

b) Brain extraction at adolescent-adult timepoints: The animal will be anesthetized via an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. Subsequently, the brain will be quickly prepared out of the skull and immediately used for further experiments on the molecular and cellular levels. This approach ensures that the animals suffer as little discomfort as possible, while allowing us to measure gene expression in various parts of the brain's motor pathways. The use of *ex vivo* preparations allows for very precise localization and quantification of gene expression and circuit layout that would not be possible in any other way.

Special case electrophysiology: Transport to the lab (mild, 5 min, once), followed by terminal anaesthesia, decapitation and organ extraction (non-recovery, <1 minute, once): To fully understand the effects of language-related gene defects on the physiological level, i.e. the function of the brain's motor circuits, we aim to measure the electrophysiological properties of single cells and cell networks in acute brain slices of adolescent and adult mice. If done correctly, freshly extracted brain tissue can be cut into acute slices, in which most neurons keep living and functioning for up to 12 hours. During this time, the electrical activity of those neurons, and the networks they form, can then be probed in our specially equipped electrophysiology laboratory. The electrophysiological portion of the experiments necessitates transport of the live animal into our specially equipped electrophysiology laboratory, which is located in the same building complex as the CDL. The transport to our specially equipped electrophysiology lab is absolutely essential, since the technique requires immediate processing of the brain (< 1 minute after decapitation) in order to yield viable material. After processing, the tissue is extremely sensitive to movement, making any further transportation impractical. The animals will only experience mild discomfort during transport to the laboratory, which happens indoors and lasts for about 5 minutes. Once in the laboratory, they will be immediately anesthetized and decapitated, keeping discomfort to the animals to a minimum. This approach allows us to study the neurons in a well-controlled environment, and in much greater detail and with higher yield than would be possible *in vivo*.

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

The maintenance of the genetically modified lines for stock purposes will be kept to the necessary minimum, i.e. usually one breeding trio per line and their most recent offspring. Often, as in timed-breeding for embryonal timepoints, the concurrent extraction of the sacrificed mother's brain will provide an additional data point. To ensure compatibility and prevent backcrossing, all mice will be maintained on a single genetic background (C57/BL6).

In order to estimate the animal numbers required for experiments, we will use the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05.

B. The animals

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

Species:

This appendix covers breeding of genetically modified mice with the possibility of offspring experiencing discomfort. Currently, this only is the case with heterozygote - heterozygote mutant *Foxp2* R553H or S321X breedings, where homozygous offspring (ca. 25% of the litters) is known to suffer moderate discomfort. These crossings are crucial to this project, as they provide the strongest neuronal phenotype and thus enable us to investigate the affected circuitry with much less animals than would be possible if we only used heterozygous animals. Additional transgenic lines (e.g. GFP constructs) may be crossed with the *Foxp2*-mutant mice as experiments necessitate, provided that the resulting offspring suffers no additional discomfort from the transgenes. For example, we currently use GFP construct lines to label experimentally relevant neuron populations in the striatum, an important part of the brain's motor circuitry. Having specific neuron populations readily labelled is an invaluable tool for our experiments: It enables us to specifically target well-defined subpopulations without the need for additional discomfort for the animals, contrary to labelling with e.g. viral injections. Furthermore, the mouse is an ideal model organism for this type of research, because it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans, yet also uniquely amendable to genetic modifications. Mice share large genetic similarity with humans, and their brain's motor control circuitry has also been shown to be very similar. Taken together, these factors mean that mice are the model of choice for our project to completely characterize the influence of language-related gene defects from the molecular to the behavioural level.

Origin:

The *Foxp2*-mutant lines described above are already well-established and successfully bred by both applicant groups under several successfully reviewed projects. Heterozygotes for breeding will be taken from our own stock, and bred according to well-established standard protocols. Their homozygous mutant offspring will be used for experiments typically early in life (before P21), because the homozygous mutants usually die before reaching reproductive age. Heterozygote and wild-type animals will be either used for experiments or euthanized. Heterozygotes may be maintained for further breeding under this procedure until adulthood (< postnatal day 300).

Estimated numbers:

From previous experience, we estimate to need 3400 animals for this procedure over the next five years. Of the total contingent of animals in this procedure, only ca. 20% (heterozygous mutants) will actually experience discomfort, and the remaining 80% will not suffer any discomfort from their genotype.

The numbers for heterozygotes are higher because those mice are also used as a source for embryos for primary neuronal cultures. Therefore, using comparatively few mice, we are able to support a major *in vivo* portion of the project, thus minimizing animal use. Breeding Foxp2-mutant mice in Het - Het crossings is indispensable for this project's objective, since the resulting homozygous mutant mice have the strongest brain-related phenotype, and thus allow us to probe more intricate mechanisms than would be possible with the heterozygotes alone.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse (C57BL6J) with homozygous Foxp2 mutation	Own breeding	800	Embryonal - early adulthood (P30)
Mouse (C57BL6J) with heterozygous Foxp2 mutation or Wildtype mouse	Own breeding	2600	Embryonal - adulthood (P<300)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The experiments build on a large volume of research by the involved research groups, mainly in cell cultures. Those cell cultures include immortalized cell lines, such as HEK293 or SHS5Y5 cells, which do not require the sacrifice of animals at all, and primary neuronal cultures,

which are a very efficient use of extracted embryonal neurons. Immortalized cell lines are well-suited to research into basic molecular and genetic effects of our genes of interest, but do not form any neuronal connections. Primary neuronal cultures form random connections while growing *in vitro*, and thus are well-suited to assess general synaptic phenotypes at the single-cell level. However, neuronal cultures are not as well-suited to model complex processes that involve multitudes of different cell types. Our research questions also concern complex, interdependent processes such as brain development, wiring, or circuit function, all of which also require studying intact mouse brains. Thus, the single-cell perspective we gain from cell cultures will form the basis on which we formulate our hypotheses to test on the circuit level in *ex vivo* brain preparations from mouse models.

Reduction:

-Furthermore, the use of primary neuronal cultures from embryonic neurons greatly reduces the number of animals required to answer questions on the molecular and cellular aspects of our study: Brains from one litter of embryos allow for the extraction of millions of primary neurons, which can be cultured and serve for the basis of multiple *in vitro* experiments lasting several weeks. This is specifically important in this procedure, since it means that a large volume of research on heterozygous mutant brains is taking place *in vitro* with prepared neurons from embryonal brains, thus greatly reducing the need for homozygous mutants to be born.

- The inclusion of homozygous mutants into our research plan allows us to investigate graded effects from unaffected (homozygous wild-type) to severely affected (homozygous mutant), thus allowing us to have multiple, interlinked controls within each litter. Furthermore, comparing heterozygous and homozygous mutant mice will allow to identify genetic compensation mechanisms likely at play, where related genes take over part of the function. Identifying those clinically relevant mechanisms would not be possible when only using heterozygous mutant mice.

Refinement:

-To guarantee the best possible environment and minimize chances of contamination for the animals, they will be housed in sterilized individually ventilated cages (IVCs), receive sterilized food and drinking water, and only be handled under a flow hood. This housing regime is considerably more sophisticated than the filter top cages commonly used for similar experiments, and adds additional layers of isolation from potentially interfering outside influences, such as viral infections.

- In addition, the use of anaesthesia in all terminal procedures actively minimizes animal discomfort. The use of the volatile anaesthetic isoflurane before electrophysiology experiments additionally ensures that the resulting brain slices, in which neurons live and function for several hours after preparation, are not influenced by anaesthetics residues.

- The timed breeding required for embryonal timepoints will be done only after ensuring optimal fertility (via oestrus cycle measurement) and checking for mating afterwards (via vaginal plug inspection), thus ensuring that the animals are only bred when chances of conception are optimal.

- The intercrossing of "marker" lines expressing fluorescent proteins in specific neuronal subpopulations in the brain will allow direct identification of experimentally relevant cell populations in e.g. electrophysiological experiments. This adds an additional level of detail to our research (cell population-specificity instead of brain region-specificity), without any additional discomfort to the animal. Leading theories in the field are proposing the clinical relevance of neuronal subpopulation-specific dysfunction, which makes this labelling approach all the more relevant.

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

1) Animals will be kept in a strictly isolated environment (IVCs, see above) to minimise chances of contamination. Animals will be monitored at least weekly, and any animal showing signs of any distress will be euthanized according to the humane endpoints outlined in section J.

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?

The animals maintained under this protocol are those where a chance on discomfort exists: 25% of the offspring of a *Foxp2* mutant Het - Het crossing will be homozygous mutants and only those will be experiencing discomfort. *Foxp2* homozygotes have a lower body weight than their littermates, difficulties with the righting reflex, reduced body weight and episodes of akinesia. Despite these abnormalities, pups appear to be cared for normally by the mother; For example, pups placed outside the nest area are retrieved. Homozygous *Foxp2* mice die for unknown reasons around postnatal day 30, but histological analysis of the lung and haematocrit measurements suggest that death is not due to hypooxygenation caused by compromised lung function.

Explain why these effects may emerge.

The *Foxp2* gene is a transcription factor, i.e. broadly regulates genes during embryonic development, for example in the lung, brain and spinal cord. Homozygous mutant animals (25% of animals in this procedure) apparently breathe normally, but have difficulty to engage their motor neuron pathways. These animals are the result of interbreeding *Foxp2* mutant parents, and thus cannot be omitted from the experimental design.

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

As noted above, *Foxp2* homozygous pups can be recognised by their phenotype soon after birth, being smaller in size and displaying a slower righting-reflex. In order to minimise the impact of homozygous *Foxp2* disruption, pups will not be weaned from the mother, and food will be provided

on the cage floor in case they cannot reach the hopper. Furthermore, development will be closely monitored for especially severe courses of the developmental delay, in which the animal will be euthanized as outlined under Section J (Humane Endpoints, below).

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.

Despite the best countermeasures, animals might sometimes show signs of undue distress. Outward signs such as a ruffled fur coat or wounds, and behavioural signs such as limping, hunched back, or immobility will be taken as sign for undue distress, and the animal will be sedated and euthanized immediately.

Homozygous Foxp2 mutants:

All homozygous Foxp2 mutant animals not used for experiments will be euthanized at postnatal day P30. If at any earlier point in postnatal life they show a growth retardation of more than 50% compared to littermates (weight and/or size), they will be euthanized according to humane endpoints as well.

Indicate the likely incidence.

Of the animals described in this procedure, about 25% are going to be homozygous Foxp2 mutants that are known to suffer discomfort. The remaining 75% are heterozygous mutants or wild-type animals that do not suffer any adverse effects from their genotype. Thus, we expect the incidence of genotype-related discomfort to be around 25%. The likely incidence of discomfort from other causes is very low, as in other breedings without discomfort.

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).

Marking / tissue sampling for genotyping (mild, once, 100% of mice for this appendix): At some timepoint after the first postnatal week, the animals will be marked by an appropriate method such as earpunching, which only causes momentary discomfort. The resulting samples will be used for genotyping. In rare instances, due to technical failures in genotyping a second sample may need to be taken.

Timed breedings (mild, few minutes, several times 1000 females, 29% of a total of 3400 animals for this appendix): Precise timing of conceptions in timed breedings will be ensured, where necessary, by appropriate methods such as oestrus cycle measurement. Breeding males will be housed solitary between timed breedings, as they tend to fight with other cagemates when placed back with other males.

Euthanasia and organ extraction: The animals will be euthanized for tissue extraction in one of the two ways described:

In case of electrophysiology: Transport to the lab (mild, 5 minutes, once, 1200 animals, 35% of total 3400 animals in this appendix). On the day of the experiment, animals will be placed in cardboard boxes with bedding material provided by the CDL staff. They will be quickly transported to our specially equipped electrophysiology lab in the Radboudumc, which is within the same building complex as the animal laboratory. The only discomfort the animals are going to experience during this time is movement and unfamiliar surroundings. Once in the laboratory, the animal will directly be euthanized and have their brains extracted as outlined below.

Euthanasia for tissue extraction (non-recovery, <1 minute, once, 2200 animals, 65% of total 3400 animals in this appendix, Of those, the 1000 animals for embryo extraction will have undergone timed breeding as described above): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as isoflurane (in case of electrophysiology) or pentobarbital (for all other applications), and the absence of pain reception will be tested via e.g. forepaw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation). Animals will be killed via cervical dislocation, decapitation, or transcardial perfusion, as the experiment necessitates. Typically, the brain will be extracted. In some cases, the brain will be extracted along with embryos of a defined developmental age.

For homozygous *Foxp2*-mutant mice (800, or 25% of all mice in this procedure): moderate discomfort throughout postnatal life. As mentioned above, these animals suffer motor-coordination problems and delayed growth, and will be used for experiments between postnatal day 8 (adolescence) - P30 (adulthood). In the rare cases they will not be used in experiments, they will be euthanized at P30 according to humane endpoints as outlined in Section J. ,

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.

If the animals are not going to be used in other procedures first, they will be either maintained for stock breeding (only heterozygotes) or sacrificed for tissue harvesting. This entails harvesting brains from postnatal animals (adolescence – adulthood) for various measurement methods such as electrophysiology or stainings. Additionally, developmental aspects will be studied mainly in embryos of mid-late embryonal stage, which requires sacrifice of the pregnant mother. Harvested embryos will be used directly in experiments (e.g. stainings), or as a source of primary neurons for cell culture. Using *ex vivo* brain preparations for most of our experiments carries several advantages: Firstly, by slicing and staining for gene expression, one brain can be very efficiently used to investigate expression of several genes, with much more detail than would be possible otherwise (i.e. with *in vivo* imaging). In addition, this procedure keeps the discomfort to the animal to a minimum, as they do not suffer more than momentary additional discomfort during the euthanasia. Secondly, by using primary neurons derived from late-stage embryos for cell culture, we are able to use the brains very efficiently: One litter of embryos provides millions of primary neurons that can be cultured and studied in much greater detail and with much better environmental control than would otherwise be possible. Electrophysiology on acute brain slices of adult brains likewise allows for much better control over environmental variables (e.g. neurotransmitter levels) and measurements with single-cell precision that would not be

possible in *in vivo* recordings. Since the only additional discomfort the animal suffers from the euthanasia procedure is momentary and mild during the transport and anaesthesia, this is the optimal approach to investigate cellular and network properties while keeping animal discomfort to a minimum.

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.
- 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 3	Type of animal procedure Substance administration and organ extraction

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.

Primary goal:

The primary goal of this research project is to unravel the function of language-related genes in the motor system of the mammalian brain. We aim to investigate the function of those genes on the molecular, cellular, physiological and behavioural level. In an advanced stadium of our research, we will attempt to systematically modify synapses or cell populations in living mice before the experiments, thus attempting to rescue the phenotype uncovered in earlier experiments. Thus, it is a prerequisite for the final experiments in the cellular, physiological and behavioural aspects of the projects.

General Design:

This appendix covers the experiments in which the mice get exposed to substances for targeted genetic modification (e.g. plasmids encoding GFP), labelling (e.g. anatomical tracers) or modification of protein function (e.g. interfering peptides). If the substances are broadly targeted, they will be administered by minimally invasive methods such as intraperitoneal injection. In cases where focal application in the brain is required, the animals will undergo a survival surgery procedure (small craniotomy + stereotactic injection) followed by a short period (< 3 weeks) to allow for recovery of the animal and transport/expression of the applied substance. In the special case that the modification makes neurons sensitive to stimuli such as light (when using virally-mediated optogenetics), a stimulator (e.g. glass fiber for light transduction) will be chronically implanted in the same survival surgery procedure.

Justification:

This approach is only going to be used in advanced stages of the project, meaning that it will be used to test the specific hypotheses built in previous, less invasive experiments (outlined in Appendix 1 & 2). For example, previous experiments have indicated that a specific synaptic pathway in a specific subpopulation of neurons is dysfunctional in Foxp2 mutants. In this case, we would try to rescue the phenotype by systemic intraperitoneal injection of a peptide known to block activity along this synaptic pathway. The animals would subsequently be sacrificed, and the function of these synaptic pathways would be studied using single-cell electrophysiology. If the electrophysiology shows a rescue of the phenotype, similarly treated animals would be tested in behavioural assays (Appendix 4). To summarise, this approach keeps the use of invasive techniques to a minimum, while being tightly controlled at each step. Where possible, globally-acting substances will be used because they can be administered via intraperitoneal injections or gavage, which considerably reduce discomfort for the animals. Only in cases where focal application to the brain is indispensable, we will use the survival surgery procedure. Also here, those experiments are strictly to verify previous theories or rescue the phenotype with targeted interventions. Together, these strict rules ensure that the use of invasive procedures for this project is kept to a minimum.

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

Animals will be taken from stock breeding (see Appendix 1 & 2). To achieve the best possible protection from contamination, the animals will be kept in a barrier environment such as individually ventilated cages (IVCs), fed sterilized chow food, and only handled under a flow hood. This setup is especially important for post-surgical care, because it greatly reduces the exposure of animals to potentially hazardous external influences.

All procedures will be carried out in the building complex of the central animal facility (Centraal Dierenlab, CDL) Nijmegen. The electrophysiology experiments necessitate transport of the live animal into the electrophysiology laboratory, which is located in the same building complex as the CDL.

Substance administration:

The mice will be given a dose of experimentally relevant substances, via one of the following routes:

a) Globally-acting substances (mild, one or several applications):

* Oral gavage: Mice will receive liquid substances, e.g. pharmaceutical compounds, via a blunt syringe.

* Addition to the food or drinking water for up to several weeks.

* Injection: One or several doses with globally targeted effects. Injection routes are either intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular injections.

Justification a): These routes of administration are chosen to ensure that the animal receives the appropriate dose with minimal discomfort. If administration via the digestive tract is possible, the animal will receive the substance via food /drinking water (low dose) or oral gavage (high dose). If the substance cannot be absorbed via the digestive tract, it will be administered via injections at either intraperitoneal, subcutaneous or intramuscular injections, depending on e.g. the required dose and release properties. Together, these approaches ensure that globally acting substances are administered with as little discomfort as possible.

b) Brain-specific injection / implantation (moderate; single surgery with up to 3 weeks post-op survival time):

Animals are going to be anesthetized via inhalation of an isoflurane/carbogen (95% O₂, 5% CO₂) inhalation. Body temperature and depth of anaesthesia will be constantly monitored throughout the procedure. The head will be fixed in a stereotactical frame, followed by local anaesthesia and sterilization at the scalp, and the creation of a small craniotomy. Next, a small quantity of gene-expression vectors (viruses) or anatomical tracers will be delivered to stereotactically defined brain areas. Following injection / implantation, the wound will be re-sealed, disinfected, and local anaesthesia will be applied again. The animal will receive a general analgesic to aid recovery. Next, the animal will be kept warm until they show coordinated movement, then moved to their home cage and closely monitored for the next two hours. Antibiotics will be provided in the drinking water if needed. If the animal shows signs of post-operative distress, it will receive another dose of analgesics in 8-hour intervals and closely monitored. If the animal shows no betterment over the next 48 hours, it will be processed according to humane endpoints as outlined below. To allow for transport and expression of the stereotactically injected substances, a survival time of up to three weeks is necessary. At the end, animals will be either re-used in behavioural paradigms (see Appendix 4), or sacrificed for brain extraction and use in either stainings or electrophysiology.

Special case Optogenetics (Surgery plus stimulator implantation): If the injected virus changes the response qualities of the targeted neurons, as is the case in optogenetic modifications that make the neurons sensitive to light pulses, an appropriate stimulus delivery device (e.g. a glass fibre) will be implanted in the same procedure.

Justification b): This survival surgery procedure forms a crucial part of our project's advanced stage. Only when previous *ex vivo* experiments have provided a testable hypothesis about brain regions or neuronal subpopulations, we will proceed to test (and attempt rescue of the phenotype) those hypotheses with the *in vivo* experiments described here. Stereotactic injection under general anaesthesia allows to minimize animal discomfort while enhancing specificity, as it allows to precisely target specific brain regions through a minimal craniotomy (<1 mm²). General anaesthesia, combined with extensive use of local anaesthesia and post-op analgesics, ensures that the animals suffer as little discomfort as possible during surgery and recovery. In addition, the strict post-operative surveillance regime we have planned will safeguard against undetected discomfort due to recovery.

Terminal anaesthesia, sacrifice and organ extraction, as described in Appendices 1+2 (non-recovery, <1 minute, once)

Embryo extraction: The pregnant mothers will be anesthetized with an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. The embryos will be extracted to prepare *ex vivo* brain material for use in stainings, cell culture, or electrophysiological experiments. This procedure keeps discomfort

to the pregnant mother to a minimum, and the use of embryonal brains (especially for primary neuronal cultures) allows us to make very efficient use of the sacrificed animals, as millions of cells can be extracted and cultured for *in vivo* experiments. To add additional use per sacrificed animal, we will consider in our experimental plans to concurrently extract the pregnant mother's brain along with the embryos.

Brain extraction at adolescent-adult timepoints: The animal will be anesthetized via an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. Subsequently, the brain will be quickly prepared out of the skull and immediately used for further experiments on the molecular and cellular levels. This approach ensures that the animals suffer as little discomfort as possible, while allowing us to measure gene expression in various parts of the brain's motor pathways. The use of *ex vivo* preparations allows for very precise localization and quantification of gene expression and circuit layout that would not be possible in any other way.

Special case electrophysiology: Transport to the lab (mild, 5 min, once), followed by terminal anaesthesia, decapitation and organ extraction (non-recovery, <1 minute, once): To fully understand the effects of language-related gene defects on the physiological level, i.e. the function of the brain's motor circuits, we aim to measure the electrophysiological properties of single cells and cell networks in acute brain slices of adolescent and adult mice. If done correctly, freshly extracted brain tissue can be cut into acute slices, in which most neurons keep living and functioning for up to 12 hours. During this time, the electrical activity of those neurons, and the networks they form, can then be probed in our specially equipped electrophysiology laboratory. The electrophysiological portion of the experiments necessitates transport of the live animal into our specially equipped electrophysiology laboratory, which is located in the same building complex as the CDL. The transport to our specially equipped electrophysiology lab is absolutely essential, since the technique requires immediate processing of the brain (< 1 minute after decapitation) in order to yield viable material. After processing, the tissue is extremely sensitive to movement, making any further transportation impractical. The animals will only experience mild discomfort during transport to the laboratory, which happens indoors and lasts for about 5 minutes. Once in the laboratory, they will be immediately anesthetized and decapitated, keeping discomfort to the animals to a minimum. This approach allows us to study the neurons in a well-controlled environment, and in much greater detail and with higher yield than would be possible *in vivo*.

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

The animals will be pre-selected to have the appropriate genotype and ideal age for the experiment, thus minimising the number of animals going into the procedure. The experiments described here will form the last step to mechanistically and directly prove influence of the targeted systems, and thus the hypotheses to test will already be closely focused by previous experiments. Because very specific hypotheses can be tested, we expect the animal numbers to be low.

In order to estimate the animal numbers required for experiments, we will use the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05.

B. The animals

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

All experiments will be done in genetically modified mice. Mice will be taken from general breeding stock (described in Appendix 1, **1360 mice**). If necessitated by the experiment, Foxp2-mutant mice from the heterozygote x heterozygote crossing that may suffer mild discomfort (bred under a

separate protocol, see Appendix 2, 1400 mice) will be used. Of those mice from Appendix 2, 600 (43% of 1400) are going to suffer moderate discomfort due to their genotype. This approach allows us to precisely control all parameters of the experiment before the substance administration. Since the mice used in this appendix are merely bred and maintained under Appendices 1 and 2, and are experimentally manipulated only as described here, their numbers will be registered under this Appendix (App. 3) and not for 1 or 2.

Furthermore, the mouse is an ideal model organism for this type of research, because it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans, yet also uniquely amendable to genetic modifications. Mice share large genetic similarity with humans, and their brain's motor control circuitry has also been shown to be very similar. Taken together, these factors mean that mice are the model of choice for our project to completely characterize the influence of language-related gene defects from the molecular to the behavioural level.

Estimated numbers:

Since the described experiments are to test very focused hypotheses following from previous experiments described in the other appendices, we expect to need 2760 animals over the next five years, 21% of a total 13280 animals for the entire project. As stated above, we expect animal numbers to be low, because the experiments described herein will only be started once previous, less invasive experiments (such as *in vitro* and *ex vivo* preparations as described in Appendix 1 + 2) have resulted in clear, testable hypotheses. These experiments will enable us to make the crucial link between the cellular phenotypes found in the earlier experiments and the circuit-wise defects that result from them. Precise knowledge of circuit-level defects, in turn, will enable us to formulate mechanistic predictions about the specific behavioural aspects affected by mutations in language-related genes.

Life stages:

Animals will be used at the adolescent - adult stage (postnatal day > 14) for both gavage and surgery. We chose adolescent and adult timepoints because they provide optimal insight into the clinically relevant states of the mutant brain: Adolescence in mice roughly maps onto the first postnatal years in humans, which allows detailed research into the initial set-up of the motor system that is crucial for language in humans. Measuring in adulthood, on the other hand, is crucial to investigate the long-term effects of language-related gene defects.

To study embryonal development, in few cases, pregnant females will also be used for administration of neuroanatomical markers and pharmacological compounds. The former allows for "birthdating" neurons, which yields crucial insights into aspects of e.g. cortical development, where neurons with different functions are born sequentially. The latter is part of the rescue aspect of this procedure, as many defects observed in the adult brain have a developmental origin. Therefore, one promising prospect is to rescue these phenotypes by corrective action already during embryonal development.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse C57BL6J with genetic modifications in the Foxp2 gene (without discomfort)	Own breeding (see appendix 1,2)	600	Adolescence - adulthood (P14-P180)
Mouse C57BL6J with genetic modifications in the Foxp2 gene (with discomfort)	Own breeding (see appendix 2)	800	Adolescence - adulthood (P14-P180)
Mouse C57BL6J Mice with genetic modifications in other Foxp family member genes	Own breeding (see appendix 1)	800	Adolescence - adulthood (P14-P180)

Mouse C57BL6J with genetic modifications in genes whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders	Own breeding (see appendix 1)	400	Adolescence - early adulthood (P14-P30)
Mouse C57BL6J with genetic modifications to express transgenes such as LacZ, eGFP and Cre in a restricted manner	Own breeding (see appendix 1)	160	Adolescence - adulthood (P14-P180)

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

- The substance administration experiments described in this procedure will only be started once previous experiments with cell cultures *in vitro* and sliced *ex vivo* preparations have resulted in a specific, testable hypothesis. Thus, we expect to require very low numbers of animals for the *in vivo* experiments described here.

Reduction:

- The animal strains will be carefully chosen with regards to the current needs of the experiments. For example, we reduce the variability in our

samples by measuring with littermate controls wherever possible. This allows us to reach stronger effect sizes with smaller groups of animals due to lower variability.

- The sophisticated post-surgery monitoring and care scheme planned here greatly enhances the animal's chances of survival, thus leading to a reduced number of animals required for the final experiment.

Refinement:

-To guarantee the best possible environment and minimize chances of contamination for the animals, they will be housed in sterilized individually ventilated cages (IVCs), receive sterilized food and drinking water, and only be handled under a flow hood. This housing regime is considerably more sophisticated than the filter top cages commonly used for similar experiments, and adds additional layers of isolation from potentially interfering outside influences, such as viral infections. This is especially relevant in the context of post-surgical care, as a better protection of the animals from outside influences enhances the post-surgical recovery prospects.

- The use of anaesthesia and analgesics during surgery and recovery keeps the animal's discomfort to a minimum. In addition, the strict monitoring scheme proposed for post-op care also serves to minimize animal discomfort during recovery.

- In addition, the use of anaesthesia in all terminal procedures actively minimizes animal discomfort. The use of the volatile anaesthetic isoflurane before electrophysiology experiments additionally ensures that the resulting brain slices, in which neurons live and function for several hours after preparation, are not influenced by anaesthetic residues.

- Rescue experiments are the ultimate proof that the gene of interest's function has been understood sufficiently to allow for reversal of the phenotype via targeted interventions. A successful rescue thus greatly enhances this research project's relevance for future clinical application.

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

1) Animals will be in a strictly isolated environment (IVCs, see above) to minimise chances of contamination. Animals will be monitored at least weekly, and any animal showing signs of excessive distress will be processed according to the humane endpoints outlined in section J. During surgery, the animals will be kept under anaesthesia, sufficiently deep to feel no pain (periodically assessed via paw pinching reflex), but sufficiently light to still breathe autonomously. All surgery work will be carried out in aseptic conditions with sterilized tools, in specialized facilities of the CDL. All areas surrounding the craniotomy will be sterilized and locally anesthetized during and immediately after the surgery by application of a topical anaesthetic. At the end of the surgery procedure, the animal will receive a general analgesic to reduce pain during recovery. The analgesic (and/or antibiotics) will be re-administered if the animal shows any sign of distress in the weeks following surgery.

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?

H. Pain and pain relief

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?

Post-administrative effects: In the case of general administration via oral gavage or injections, there are low risks of side-effects of pharmacological compounds. There is a very low risk of intra-abdominal damage and peritonitis from injections. Gavage will cause some minor discomfort on each administration. Global labelling agents such as BrdU (used for labelling dividing cells to "birthdate" neurons), might be carcinogenic; However, the time between administration and euthanasia (<2 weeks) is far too short for the animals to develop any tumors.

Post-surgical effects: There is a low risk of an inflammatory reaction at the craniotomy site, which will be closely monitored to ensure that the animal does not develop complications. Furthermore, animals will need to be housed alone in their home cage to prevent other animals from interfering with the sutures and healing of the surgery site, as they would during normal grooming.

Explain why these effects may emerge.

Post-administrative effects: Those mostly relate to needle trauma or mis-injection, both for oral gavage and injections. The risk of those effects is low, and will be reduced further by thorough training of any researchers and staff involved in the procedure.

Post-surgical effects: Since the surgery involves a craniotomy and, in some cases, implantation of a stimulus device onto the skull, the surgery site will have to heal during the recovery period. The risk of inflammation is low, and mostly relates to over-grooming of the sutures by the animal as part of normal grooming behaviour. The risks will be minimised by a sterile surgery environment, thorough training of any researcher and staff involved, and close monitoring of the animal post-surgery.

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

For oral gavage, injections, and surgery, thorough training by an experienced scientist and/or technician is crucial to minimising the risks during administration. Furthermore, the animals will be closely monitored during and after administration to ensure that they do not suffer undue distress. Post-operative care: The animal will be kept warm (e.g. under a heating pad) following surgery until coordinated movement is visible, then placed in its home cage and monitored until alert. If the animal shows signs of pain or distress from the surgery site, it will be administered analgesics as needed. If any sign of inflammatory reaction is seen, the animal will be given antibiotics and anti-inflammatory medication as needed. Following the

surgery, the animals will be closely monitored at least daily and behavioural parameters (mood, activity, state of the surgical site) will be scored and noted.

In all cases, if the animal shows bodily (e.g. ruffled fur coat or wounds) or behavioural (e.g. limping, hunched back, or immobility) symptoms indicating undue distress, it will be euthanized according to the humane endpoints outlined below.

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.

General:

Despite the best countermeasures, animals might sometimes show signs of undue distress. Outward signs such as a ruffled fur coat or wounds, and behavioural signs such as limping, hunched back, or immobility will be taken as sign for undue distress, and the animal will be sedated and euthanized immediately.

Surgery:

For survival surgeries, the animal will be monitored daily post-surgery, and the state of the surgery site, behaviour, and level of activity will be scored and noted. If the animal does show any signs of distress, it will be given analgesics and antibiotics. In case the animal does not show betterment 48 hours after treatment, it will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is very low in the case of gavage side-effects such as needle trauma. It is low for adverse post-surgery outcomes such as inflammation.

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).

Substance administration: Animals are going to undergo one of the two following treatments: Administration (mild, <1 minute, once or several times 520 animals (19% of totally 2760 for this Appendix), of which 120 (4.3% of total 2760) with additional moderate discomfort due to their genotype. The administration via oral gavage and injection will cause a short moment of mild discomfort upon each administration. Gavage via drinking water will cause no additional discomfort.

Survival surgery / implantation (surgery: mild, ca. 2 h, recovery: moderate, ca. 1 week). 2240 animals (81% of totally 2760), of which 480 (17% of totally 2760) with additional moderate discomfort due to their genotype. The survival surgery and possible implantation will be done under anaesthesia, and pain will be reduced post-operation by application of analgesics as necessary. Yet, during the recovery period, the healing of the surgery site will induce moderate discomfort for the animal. Usually, the animals take a few days to recover, depending on the size of the craniotomy and the health status of the animal. After recovery, animals will generally not suffer further distress. Only in the case of chronic implantations there will be persistent mild discomfort due to constraints on the movement freedom.

Further use: Following substance administration, animals are either going to be euthanized in one of the two ways described below. This will be subject to a go/no-go decision (only if both behavioural and surgery procedures have produced encouraging data), and will be closely coordinated with the local animal welfare body.

In case of subsequent organ extraction: Transport, anesthesia and euthanasia as described in Appendix 1+2:

In case of electrophysiology: Transport to the lab (mild, 5 minutes, once). On the day of the experiment, animals will be placed in cardboard boxes with bedding material provided by the CDL staff. They will be quickly transported to our specially equipped electrophysiology lab in the Radboudumc, which is within the same building complex as the animal laboratory. The only discomfort the animals are going to experience during this time is movement and unfamiliar surroundings. Once in the laboratory, the animal will directly be euthanized and have their brains extracted as outlined below.

Euthanasia for tissue extraction (non-recovery, <1 minute, once): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as isoflurane (in case of electrophysiology) or pentobarbital (for all other applications), and the absence of pain reception will be tested via e.g. forepaw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation). Animals will be killed via cervical dislocation, decapitation, or transcardial perfusion, as the experiment necessitates. Typically, the brain will be extracted. In some cases, the brain will be extracted along with embryos of a defined developmental age.

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.

Animals will be used further in behavioural testing (see Appendix 4), or sacrificed an appropriate time after the substance administration for organ harvesting (typically brain and/or embryos). The latter entails harvesting brains from postnatal animals (adolescence – adulthood) for various measurement methods such as electrophysiology or stainings. Additionally, developmental aspects will be studied mainly in embryos of mid-late embryonal stage, which requires sacrifice of the pregnant mother. Harvested embryos will be used directly in experiments (e.g. stainings).

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.
- 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>Behavioral testing and organ extraction</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	4	Behavioral testing and organ extraction
Serial number	Type of animal procedure					
4	Behavioral testing and organ extraction					

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.

Primary goal:

The primary goal of this research project is to unravel the function of language-related genes in the motor system of the mammalian brain. We aim to investigate the function of those genes on the molecular, cellular, physiological and behavioural level. This animal procedure describes the behavioural experiments.

General Design:

This appendix covers the assessment of behavioural performance in the genetically modified mice described in the previous three appendices. To functionally validate the neuronal phenotypes of our mouse models *in vivo*, we plan to assess motor function, as well as general cognitive performance. This allows us to integrate the hypotheses generated from previous genetic and neuronal circuit-level research with data on behavioural output. Behavioural paradigms also allow experimental rescue, where a deficient phenotype is restored by targeted interventions, demonstrating the functional relevance of the hypothesis.

Our outcome parameters will be to precisely quantify a mutation's influence on a specific task, matched to the type of circuitry that is thought to underlie the behaviour. For example, carriers of a global mutation in the *Foxp2* gene are expected to have deficiencies in numerous parts of their motor circuitry. Therefore, experiments with these strains focus on challenging motor tasks, and targeted interventions for rescue experiments will manipulate specific parts of the motor circuitry.

In order to enrich the behavioural data with additional insight into the neurological underpinnings of the expected motor defects, the tested animal's brain is going to be extracted and assayed on micrometer scale after completion of the behavioral paradigm. As described in the other appendices, the animals will be terminally anesthetized, then quickly sacrificed. Subsequently, the brains will be extracted for quantification of single-cell level gene expression (i.e. via stainings). This approach allows us to link single-cell level gene expression to behavioural performance, providing unique insight into the mechanistic link between gene defect and behavioural phenotype.

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

Behavioural experiments (mild, several hours/day, <2 weeks):

Motor coordination will be assessed by using well-defined tasks: the accelerating rotarod and the tilted running wheel: These are non-stress motor-coordination paradigms.

Rotarod task: In this task the animal is placed on a rotating beam which rotates with increasing speed. Animals will be placed on this rotarod repeatedly, in several sessions per day, and scored for both duration (time to fall per day) and learning rate (increase in time to fall between days).

Rotarod experiments are only mildly discomforting and therefore can be used on consecutive days. We estimate to need approximately ten measuring days to properly assess motor performance.

Tilted running wheel: Tilted running wheel: This is a disc shaped running wheel which can be placed in the animals' home cages. As such running time (a measure of activity) and running bout length (a measure of exhaustion and coordination) can be assayed. The test is self-paced, meaning that the animal will freely engage in the running behaviour *ad libitum* and does not suffer any discomfort, not even handling or unfamiliar environments. However, the task requires that the animal be housed in its cage alone, which causes mild discomfort for the duration of the task
Justification Behaviour: These methods are among the least discomforting behavioural paradigms. Contrary to other behavioural paradigms such as fear conditioning, the animals will not be exposed to painful or otherwise aversive stimuli. Also, the assays mostly use naturally occurring behaviour patterns, therefore preventing potentially discomforting motivation paradigms such as water deprivation

Anaesthesia, euthanasia and organ extraction (non-recovery, >1 minute, once):

Following the end of the behavioural sessions, in some cases, the animal will be terminally anesthetized via an anaesthetic such as pentobarbital, then quickly sacrificed. Subsequently, the brain will be quickly prepared out of the skull and immediately used for further experiments on the molecular and cellular levels.

Justification brain extraction: This approach ensures that the animals suffer as little discomfort as possible, while allowing us to measure gene expression in various parts of the brain's motor pathways. The use of *ex vivo* preparations allows for very precise localization and quantification of gene expression and circuit layout that would not be possible in any other way. This approach furthers the goal of linking the behavioural performance to single-cell level properties such as gene expression, which can be assessed with stainings.

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

We expect the differences between animal groups to arise largely due to genotype. In order to estimate the animal numbers required for experiments, we will use the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05.

We are, in some instances, able to use one animal for multiple behavioural tests, depending on the specific task. We will be able to minimize the number of animals both by proper choice of experimental paradigm and measurement method.

B. The animals

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

We will use transgenic mice bred and maintained at the CDL Nijmegen (described in Appendix 1 and 2). Of these, 720 are going to be derived from the breeding stock for the lines described in Appendix 1, and 720 are going to be taken from the breeding as described in Appendix 2. Of the Appendix-2-derived mice, 240 (33%) are going to suffer moderate discomfort due to their genotype. It should be noted that these animals are merely bred and maintained under Appendices 1 and 2, and the experimental manipulation of this group is going to happen as described in this Appendix (App. 4). Therefore, the animals of this group are going to be registered under Appendix 4, and not under Appendices 1 and 2.

Animals might have been subjected to procedures outlined in appendix 3 ("Substance Administration") prior to the behavioural assessments described here. The choice for this is highly dependent on experimental outcome and will lead to a go/nogo moment during the research.

Nonetheless, we will conduct behavioral experiments with the animal numbers outlined here

Using mice bred in our own colony allows to select mice of optimal age for the experiment. Furthermore, the mouse is an ideal model organism for this type of research, because it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans, yet also uniquely amendable to genetic modifications. Mice share large genetic similarity with humans, and their brain's motor control circuitry has also been shown to be very similar. Taken together, these factors mean that mice are the model of choice for our project to completely characterize the influence of language-related gene defects from the molecular to the behavioural level.

Estimated animal numbers and life stages:

We expect to require ca. 1440 animals between adolescent and adult ages (postnatal day 14 - 6 months of age) for this procedure, 11% of the total of 13280 mice for the entire project. These ages are ideally suited to probe the developmental trajectory of different modifications, allowing deep insight into the function of the motor circuitry of these mice. Contrasting adolescent and adult animals will allow us to identify developmental delays, a prominent feature in many human speech disorder phenotypes.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse C57BL6J with genetic modifications in the Foxp2 gene (without discomfort)	Own breeding (see appendices 1,2)	240	Adolescence - adulthood (P14-P180)
Mouse C57BL6J with genetic modifications in the Foxp2 gene (with discomfort)	Own breeding (see Appendix 2)	480	Adolescence - Early adulthood (P14-P30)
Mouse C57BL6J with genetic modifications in other Foxp family member genes	Own breeding (see appendix 1)	480	Adolescence - adulthood (P14-P180)
Mouse C57BL6J with genetic modifications in genes whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders	Own breeding (see appendix 1)	240	Adolescence - adulthood (P14-P180)

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.

- The mouse is at the moment the only mammal which can be used for stable genetic modifications of Foxp2. Therefore, we will need to use mice for our behavioural experiments. Mice are well suited for the type of experiments described here, are among the simplest organisms that can carry them out.

- The behavioural experiments described in this procedure will only be started once previous experiments with sliced *ex vivo* preparations have resulted in a specific, testable hypothesis. Thus, we expect to require very low numbers of animals for the *in vivo* experiments described here.

Reduction:

- The animal strains will be carefully chosen with regards to the current needs of the experiments. For example, we reduce the variability in our samples by measuring with littermate controls wherever possible. This allows us to reach stronger effect sizes with smaller groups of animals due to the lowered variability.

- Post-experiment euthanasia and brain extraction will allow to link gene expression to behavioural performance, further serving the goal of linking behavioural performance to properties of single cells in the brain's motor circuitry.

Refinement:

-To guarantee the best possible environment and minimize chances of contamination for the animals, they will be housed in sterilized individually ventilated cages (IVCs), receive sterilized food and drinking water, and only be handled under a flow hood. This housing regime is considerably more sophisticated than the filter top cages commonly used for similar experiments, and adds additional layers of isolation from potentially interfering outside influences, such as viral infections.

- Rotarod experiments have been conducted before on Foxp2 models, but only on Foxp2 mutants with a global deletion, lacking the protein in all tissues. We aim to investigate the effect of cell specific Foxp2 knockout animals (e.g. via Cre induction), or specific circuitry, e.g. Drd1+ cells in the striatum. Thus, our experiments will improve upon extant literature and probe much more specific functions of our genes of interest.

- Rescue experiments are the ultimate proof that the gene of interest's function has been understood sufficiently to allow for reversal of the phenotype via targeted interventions. A successful rescue thus greatly enhances this research project's relevance for future clinical application.

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

1) Animals will be kept in a strictly isolated environment (IVCs, see above) to minimise chances of contamination. They will be monitored at least weekly, and any animal showing signs of excessive distress will be euthanized according to the humane endpoints outlined in section J. In the rotarod experiments, the rod will be placed only slightly higher than the mouse would jump voluntarily, minimising the possibility of distress due to falling. With object recognition or reaction tests, the chance for adverse effects is very low, as the animals will not be subjected to any painful or fear-inducing stimuli.

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?

Rotarod and cognitive function tests are considered as the mildest forms of behavioural assays. as the occurrence of accidental injuries is very low, we do not expect our animals to be adversely affected by these experiments.

Explain why these effects may emerge.

Despite the best countermeasures, some animals might develop illnesses, or experience social stress due to fighting among cagemates. There is a very low chance of accidental injuries from behavioural testing, for example falling from the rotarod.

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

The height of the rotarod is carefully chosen to just above the height after which mice would jump voluntarily. This greatly reduces the chances of accidental injuries due to the mouse falling off the rotarod.
If the animal shows bodily or behavioural symptoms indicating undue distress, it will be euthanized according to the humane endpoints outlined below.

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.

Despite the best countermeasures, animals might sometimes show signs of undue distress. Outward signs such as a ruffled fur coat or wounds, and behavioural signs such as limping, hunched back, or immobility will be taken as sign for undue distress.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is very low, since the mouse strains are overtly normal in health and behaviour, and are housed in specially isolated individually ventilated cages, reducing outside exposure. All behavioural paradigms are optimized for low risk to the animal's health, rendering the likelihood of injuries during the behavioural paradigms very low.

K. Classification of severity of procedures

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

Behavioural assays (mild, several occurrences over consecutive days): The animals will be handled, i.e. picked up, placed on the rotarod / behavioural assay location, then observed for the course of a session. Subsequently, the animal will be placed in its home cage and brought back to the housing room. The assays will be repeated on consecutive days, at approximately the same time of day to insure minimal influence of circadian rhythm.

Euthanasia for tissue harvesting (non-recovery): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as pentobarbital or isoflurane, and the absence of pain reception will be tested via e.g. forepaw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation). Animals will be killed via cervical dislocation, decapitation, or transcatheter perfusion, as the experiment necessitates. Subsequently, the brain will be isolated, fixated and used for further post-mortem measurements (e.g. stainings).

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 the end of behavioural assays, the animals might be euthanized to harvest their brains, e.g. for stainings, allowing to correlate neuronal phenotypes to behavioural data. This requires a terminal procedure for the animals.

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 3: Substance administration								
Category	Experiment	Mouse Lines	# Experiments	Groups	Animals/group	Subtotal	Total	Appendix total
Mice with genetic modifications in the <i>Foxp2</i> gene (with discomfort, bred under Appendix 2)	Oral gavage	2	2	3	10	120		600
	Viral injections	2	2	3	20	240		
	Tracer injections	2	2	3	20	240		
Mice with genetic modifications in the <i>Foxp2</i> gene (without discomfort, bred under Appendix 2)	Oral gavage	4	2	2	10	160		800
	Viral injections	4	2	2	20	320		
	Tracer injections	4	2	2	20	320		
Mice with genetic modifications in other <i>Foxp</i> family member genes (bred under Appendix 1)	Oral gavage	4	2	2	10	160		800
	Viral injections	4	2	2	20	320		
	Tracer injections	4	2	2	20	320		
Mice with genetic modifications in genes whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders (bred under Appendix 1)	Oral gavage	2	2	2	10	80		400
	Viral injections	2	2	2	20	160		
	Tracer injections	2	2	2	20	160		
Mice with genetic modifications to express transgenes such as LacZ, eGFP and Cre in a restricted manner (bred under Appendix 1)	Virus Injection	2	2	2	20	160	160	2760
Appendix 4: Behaviour								
Category	Experiment	Mouse Lines	# Experiments	Groups	Animals/group	Subtotal	Total	Appendix total
Mice with genetic modifications in the <i>Foxp2</i> gene (with discomfort, bred under Appendix 2)	Motor function assay	2	2	2	30	240	240	1440
Mice with genetic modifications in the <i>Foxp2</i> gene (without discomfort, bred under Appendix 2)	Motor function assay	4	2	2	30	480	480	
Mice with genetic modifications in other <i>Foxp</i> family member genes (bred under Appendix 1)	Motor function assay	4	2	2	30	480	480	
Mice with genetic modifications in genes whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders (bred under Appendix 1)	Motor function assay	2	2	2	30	240	240	
							1440	11280

* = Embryo extractions are calculated differently, because they mainly serve as source for primary neuronal cultures. We calculate over time rather than in block-experiments: 1 pregnant mother / week, 50 weeks / year. Thus, 100 animals indicate a steady supply of 1 litter a week for 2 years. For each experiment, only one mother of one genotype is sacrificed.

T = Counts towards the total of Appendix 3.

= Counts towards the total of Appendix 4.

2015-2016	2016-2017	2017-2018	2018-2019	2019-2020
Breeding	Breeding	Breeding	Breeding	Breeding
Behavior (Foxp2)	Behavior (Foxp2)	Behavior (others)	Behavior (others)	Behavior (others)
		01-2018, last moment start new experimental procedures		07-2020 – end of project license

Appendix 1: Breeding without discomfort									
Category	Experiment	Mouse Lines	# Experiments	Groups	Animals/group	Subtotal	Total	Appendix total	Grand Total
Mice with genetic modifications in the Foxp2 gene	Embryo extraction *	5				500		5680	1
	Electrophysiology	5	5	2	20	1000			
	Postnatal extraction	5	2	2	20	400	1900		
Mice with genetic modifications in other Foxp family member genes	Embryo extraction *	5				500			
	Electrophysiology	5	5	2	20	1000			
	Postnatal extraction	5	2	2	20	400	1900		
	To Appendix 3 †						(800†)		
	To Appendix 4 ‡						(480‡)		
Mice with genetic modifications in genes whose human orthologues are relevant for neurodevelopmental disorders	Embryo extraction *	4				400			
	Electrophysiology	4	5	2	20	800			
	Postnatal extraction	4	2	2	20	320	1520		
	To Appendix 3 †						(400†)		
	To Appendix 4 ‡						(240‡)		
Mice with genetic modifications to express transgenes such as LacZ, eGFP and Cre in a restricted manner	Embryo extraction *	2				200			
	Postnatal extraction	2	4	2	10	160	360		
	To Appendix 3 †						(160†)		
Appendix 2: Breeding with discomfort									
Category	Experiment	Mouse Lines	# Experiments	Groups	Animals/group	Subtotal	Total	Appendix total	Grand Total
Mice with homozygous Foxp2-mutation (with discomfort)	Electrophysiology	4	5	1	20	400		3400	
	Postnatal extraction	4	5	1	20	400	800		
	To Appendix 3 †						(600†)		
	To Appendix 4 ‡						(240‡)		
Mice with heterozygous Foxp2 mutation or wildtype (without discomfort)	Embryo extraction *	4				1000			
	Electrophysiology	4	5	2	20	800			
	Postnatal extraction	4	5	2	20	800	2600		
	To Appendix 3 †						(800†)		
	To Appendix 4 ‡						(480‡)		

Year 1	Year 2	Year 3
Breeding mutant animals	Breeding mutant and possible transgenic animals	Breeding mutant and possible transgenic animals
Cellular localization – developmental profile	Behavioral experiments on mutant and transgenic animals Rescue experiments	
Electrophysiological characterization of mutant animals, primary neuronal cultures	Electrophysiological characterization of transgenic animals (cell / region specific mutation)	Assess viability of rescue on cellular, electrophysiological and behavioural level.

11.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0038
2. Titel van het project: :Language related genes in neurodevelopment and brain function.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de invloed van taalgenen op de hersenontwikkeling en hersenfunctie.
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: 04-05-2015
 - vragen gesteld: 11-05-2015
 - antwoorden en aangepaste aanvraag ontvangen op 21-05-2015 en herbesproken in DEC-vergadering op 02-06-2015
 - aanvraag compleet: 02-06-2015
 - anderszins behandeld: aangepaste aanvraag en finaal advies zijn op 22 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.
 - aanpassing aanvraag: 21-05-2015
 - advies aan CCD: 06-08-2015
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)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 11-05-2015
 - Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

3.1. In het projectvoorstel leggen de onderzoekers uit dat *foxp2* een transcriptiefactor is die betrokken is bij veel processen in de hersenen, en dat mutaties hierin leiden tot ernstige spraak- en taalstoornissen. In de niet-technische

samenvatting wordt het gepresenteerd als taalgen. De commissie vindt dit geen juiste weergave, en verzoekt de onderzoekers dit preciezer te formuleren. Hierdoor zal het voor leken ook begrijpelijker zijn waarom taalstoornissen in een niet-pratend dier onderzocht kunnen worden.

3.3 Het aantal muizen komt niet overeen met de aantallen uit de beschreven dierproeven. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming met elkaar te brengen. Zie ook de vraag hieronder over onderdeel B van dierproef 1.

3.5 De onderzoekers worden verzocht de percentages muizen te noemen bij de differentiatie naar mate van ongerief en er zorg voor te dragen dat deze overeenstemmen met die genoemd onder 3.4.

Project Proposal:

De commissie adviseert u geen namen van personen te vermelden.

3.1. De onderzoekers willen in de komende jaren meer genen gaan onderzoeken, en noemen *Foxp1*, *Tbr1* en *Cntnap2*. Kunnen zij beter onderbouwen waarom deze genen onderzocht zullen worden? Bevinden zij zich in dezelfde pathway als *foxp2*? Leiden mutaties in deze genen ook tot motorische problemen?

Description of Animal Procedures:

- Dierproef 1, onderdeel B. De aantallen in de tabel en de tekst komen niet overeen. In de tekst is sprake van 5680 dieren, terwijl in de tabel 5410 dieren staan. De onderzoekers vermelden hier dat er 2960 dieren voor dierproef 4 gebruikt zullen worden, terwijl er in dierproef 4 2880 dieren gebruikt zullen worden afkomstig uit dierproef 1 en 2. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.

Worden in dierproef 3 en 4 alleen dieren gebruikt die al geteld zijn in dierproef 1 en 2? Betekent dit dat in het hele project 5680 (of 5410 zie hierboven?) + 3400 = 9080 (of 8810?) dieren worden gebruikt voor dierproeven? De onderzoekers worden verzocht het totaal aantal dieren duidelijker te vermelden en in overeenstemming te brengen met het in de niet-technische samenvatting genoemde aantal.

- Dierproef 3, onderdeel K. De onderzoekers maken onderscheid naar mate van ongerief, maar vermelden hierbij niet de percentages dieren die het betreft. Zij worden verzocht dit toe te voegen.

- Dierproef 4, onderdeel A eerste vraag. Waarom kijken de onderzoekers naar cognitieve functie? Dit volgt niet logisch uit de doelstelling van dit experiment. Indien de onderzoekers het gebruik van testen voor cognitieve functie kunnen onderbouwen, worden zij verzocht hun keuze voor de genoemde parameters te onderbouwen in relatie tot de functie van de onderzochte genen.

- Dierproef 4, onderdeel A tweede vraag. Welke andere motor coördinatie taak overwegen de onderzoekers te gebruiken, en met welk ongerief zal dit gepaard gaan?

- **Datum antwoord: 21-05-2015**

Non-technical summary:

Section 3.1: You requested clarifications of the link between *Foxp2* and language disorders. We have amended the section with a more detailed description of the relation between *Foxp2* and language disorders. We also included a more detailed explanation of the link to animal research.

Section 3.2: You remarked that the numbers were not consistent between NTS, project proposal and animal procedures. We have re-calculated and corrected the numbers in all parts of the project. For clarity, we added an overview table to the project proposal.
Section 3.5: You requested addition of the animal number percentages. We have amended the text to include percentages, grouped by discomfort. We have amended Section 3.4 to match the percentages.

Project proposal:

You pointed out that the project proposal should not include names. We have amended the text throughout to replace names with equal formulations. We also changed the citation style from (Author, Year published) to (Title, Journal, Year Published). Along with the short summaries that accompany all cited publications, this citation style should help clarify the meaning of the citation.

Section 3.1: You requested clarifications to the rationale of studying additional genes such as *Foxp1*, *Tbr1* and *Cntnap2*, along with *Foxp2*. We have amended the text to include a short summary of the current knowledge about each gene, and their links to speech and language disorders.

In order to further clarify the animal numbers, we have added an overview table to Section 3.4.2 (Outline of the animal procedures). This table gives an overview of animal strains, experimental lines, expected group size, and under which animal procedures animals are going to be registered.

Description of animal procedures:

Appendix 1, Section B: You pointed out that the animal numbers between text and tables do not match. We have re-calculated the animal numbers throughout the project and amended the text and tables to match. We also added a detailed description of the planned movements of animals between different animal procedures.

Appendix 3, Section B: You requested that the descriptions also include the percentage of animals experiencing discomfort. We have amended the text to include the percentage of animals suffering discomfort. Likewise, we amended the texts of the other animal procedures to include which percentage (if any) of the animals suffers discomfort due to their genotype.

Appendix 4, Section A, first question: You requested clarifications about the link between experimental question and the planned experiments for cognitive function. Since this part is not yet crucial to the project as a whole, we have decided to remove it from the project proposal. We have amended the text to focus on the motor learning aspects. We included the reduction in requested animals for this procedure in our re-calculation of the animal numbers, and amended the animal table to reflect the change.

Appendix 4, Section A, second question: You requested clarification about the nature of the second motor learning experiment, and the level of discomfort it includes. We have amended the text to clarify that a tilted running-wheel paradigm will be used. This paradigm will cause discomfort similar to the previously named rotarod task, i.e. mild discomfort, over a comparable timeframe.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

- Aard expertise

- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- 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 het voorgenomen onderzoek, dat er op gericht is om de effecten van mutaties in taal-gerelateerde genen op moleculair, cellulair, neurofysiologisch en gedragsniveau te identificeren. Het onderzoek zal resulteren in kennis over de rol van met name het Foxp2 gen en een aantal andere genen waarmee het interacteert in de zich ontwikkelende hersenen van de muis. Voorts wordt duidelijk op welke manier defecten in deze genen resulteren in gedragsafwijkingen. De bevindingen in dit onderzoek kunnen meer algemeen gebruikt worden in andere onderzoekslijnen waarin getracht wordt het mechanisme te ontrafelen waardoor genmutaties leiden tot gedragsafwijkingen. Mutaties in Foxp2 en de genen waarmee het interacteert leiden bij mensen tot spraakstoornissen. Een spraakstoornis heeft een grote impact op het sociaal functioneren. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten op termijn mogelijk kunnen leiden tot betere diagnose en therapieën voor mensen die lijden aan een spraakstoornis met een genetische oorzaak, wat resulteert in gezondheidswinst en kostenreductie door het terugdringen van sociaal isolement. De realisatie van de verwachte resultaten vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het moleculaire onderzoek zal leiden tot het identificeren van doelen voor celresearch en electrofysiologie. Gedragsexperimenten zijn afhankelijk van de identificatie van cellulaire mechanismen die door de mutatie zijn aangetast. Deze aanpak leidt tot natuurlijke go/no go momenten. De DEC acht de geschetste tijdslijn geloofwaardig en haalbaar. De samenwerking tussen onderzoeksgroepen binnen de Nijmeegse Max Planck en Donders Instituten zal kunnen leiden tot een integraal beeld van het effect van mutaties in de onderzochte genen. De gekozen aanpak leidt dan ook tot betrouwbare uitspraken over het effect van mutaties in foxp2 en de genen waarmee het interacteert op hersenen en gedrag 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, op grond van eigen ervaring, door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het matige ongerief wordt voornamelijk veroorzaakt

door bijkomen uit de anesthesie en herstel na operatie in de verschillende muizenstammen en fenotypen en door motor-coördinatieproblemen en groeiachterstand in de homozygote Foxp2-muizen. Dit ongerief wordt in beide gevallen als matig ingeschat en treft 27% van de gevraagde 13.280 muizen. De overige dieren ondervinden licht ongerief ten gevolge van bijvoorbeeld gedragstesten en handelingen als doden onder anesthesie door cervicale dislocatie, decapitatie, of transcorticale perfusie. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven dierproeven is dus juist ingeschat.

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. Voor de primaire neuronale celkweken zijn embryo's nodig. Hersenontwikkeling, interacties tussen hersencellen en het functioneren van hersencircuits kunnen alleen ex vivo of in vivo in hersenen worden onderzocht, waarvoor dieren nodig zijn waarvan de hersenen voldoende op mensen lijken. Gedragsafwijkingen kunnen alleen in dieren worden onderzocht met een toereikend gedragsrepertoire. Het is hier van belang te vermelden dat ex vivo en in vivo experimenten gedeeltelijk vooraf worden gegaan door experimenten in kweken van geïmmortaliseerde cellen (dus in vitro onderzoek) op basis waarvan hypothesen worden geformuleerd voor verder ex vivo en in vivo onderzoek.
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. Resultaten uit celkweekexperimenten zullen gebruikt worden om gerichte hypothesen te onderzoeken in de diermodellen op het gebied van elektrofysiologie en gedrag. De sequentie moleculair > cellulair > electrofysiologie > gedrag biedt voldoende mogelijkheden om nut en noodzaak van de volgende stap te overwegen. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat de verwoorde doelstellingen kunnen worden behaald met maximaal 13280 muizen in 5 jaar.
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. Driekwart van de dieren ondergaat licht ongerief. 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 fundamentele onderzoek kunnen belangrijke nieuwe inzichten worden verkregen in de specifieke effecten van (mutaties in) genen welke betrokken zijn in de ontwikkeling van spraak en taal (bij mensen) op onderscheiden niveau's in de zich ontwikkelende hersenen van muizen.

Opheldering van de wijze waarop Foxp2 en gerelateerde genen functioneren in de muis, zal een basis kunnen leggen voor het begrip hoe defecten in deze genen resulteren in gedragsafwijkingen en spraak- en taal-stoornissen in de mens. Dergelijke resultaten zijn essentieel om gerichte

methodieken voor diagnose en therapie te kunnen ontwerpen. Het is dan ook aannemelijk dat de resultaten van het voorgenomen onderzoek in belangrijke mate kunnen bijdragen aan de uiteindelijke ontwikkeling van verbeterde modaliteiten voor diagnose en therapie bij mensen die lijden aan een spraakstoornis met een genetische oorzaak. De mogelijke ultieme gezondheidswinst bij patiënten met dergelijke aandoeningen vertegenwoordigt volgens de commissie een substantieel belang. Het beschreven onderzoek kan niet zonder proefdieren worden verricht.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 27% van de maximaal 13.280 muizen matig ongerief zal ondervinden, ten gevolgen van fenotype en/of bijkomen uit narcose en herstel na een operatieve ingreep. 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 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.

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
	NTS 20151212								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Brief CCD vragen				x		x		
4	reactie vragen CCD				x		x	x	
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
6	Beschikking en vergunning				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Bijlage dierproef 1				x		x	x	
9	Bijlage dierproef 2				x		x	x	
10	Bijlage dierproef 3				x		x	x	
11	Bijlage dierproef 4			x					
12	Projectvoorstel				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 1 0 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 0 1 . 1 0 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergiën
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Optimalisatie van therapie voor voedselallergiën met voedingssupplementen
- 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.
- 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
- Typen dierexperiment 3.4.4.1 t/m 3.4.4.4

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

W. Hecht

12-8-2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht
t.a.v. [REDACTED]
Postbus 12007
3501 AA 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
AVD108002015212

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 24 september 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 12 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' met aanvraagnummer AVD108002015212. 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

Het is de CCD niet helder op basis van welke criteria wordt besloten welke allergeen-specifieke therapie en immuunmodulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden.

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.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Datum
24 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002015212

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
- 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



> 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
AVD108002015212

Bijlagen

2

Datum 14-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 12 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002015212. 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. 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 plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2020
Titel project: Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën
Titel niet-technische samenvatting: Optimalisatie van therapie voor voedselallergieën met voedingssupplementen
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

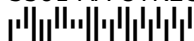
Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 12 augustus 2015



> 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
AVD108002015212

Bijlagen

2

Datum 14-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 augustus 2015

Vervaldatum: 13 september 2015

Factuurnummer: 201570212

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002015212	€ 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

Universiteit Utrecht

[Redacted]
t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn Utrecht
Postbus 12007
3501 AA 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
AVD108002015212

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 29 oktober 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 12 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' met aanvraagnummer AVD108002015212. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 08 oktober 2015 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen.

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 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' starten. De vergunning wordt afgegeven van 29 oktober 2015 tot en met 01 oktober 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd d.d. 10 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Op onderstaande punten wijken wij af van het DEC advies.

1) U heeft in uw aanvraag aangegeven alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken voor dit project. Uw overwegingen voor het alleen gebruik van vrouwelijke dieren heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. Uit uw aanvraag volgt dat voedselallergie zowel bij mannen als vrouwen voorkomt. Uw argument dat voedselallergie meer bij vrouwen dan bij mannen voorkomt, is volgens de CCD geen reden om het onderzoek met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Daarnaast heeft u uw argument dat er minder variatie zal zijn bij het gebruik van alleen vrouwelijke dieren niet met wetenschappelijk bewijs onderbouwd. U heeft ook niet aangetoond dat u bij het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uw doelstellingen niet kunt behalen. De CCD is om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken voor dit project. In dit project dient daarom een pilotstudie te worden uitgevoerd waarin vastgesteld wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en

vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

2) U heeft op 08 oktober 2015 aanvullende informatie verstrekt over de criteria op basis waarvan besloten wordt welke toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden. In uw brief geeft u aan dat u in eerste instantie subcutane en orale immunotherapie gaat vergelijken en dat het uitgangspunt van het project een dieetinterventie met prebiotica zal zijn. De vervolgstappen zijn volgens u afhankelijk van de resultaten uit de eerste dierproeven. De CCD is van mening dat u de criteria op basis waarvan u, na de eerste proeven met bovengenoemde voedingssupplementen en toedieningswijzen, gaat beslissen met welke toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen u uw onderzoek zult voortzetten niet voldoende beschreven zijn. Bovendien heeft u de criteria op basis waarvan gekozen wordt welke specifieke allergenen geselecteerd gaan worden niet beschreven. U dient daarom de criteria op basis waarvan besloten wordt welke allergeen-specifieke therapie, toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden voor aanvang van het project af te stemmen met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

3) U heeft in uw aanvraag schematisch aangegeven wat de onderlinge verhoudingen zijn tussen de verschillende type dierproeven. De CCD is echter van mening dat de criteria op basis waarvan besloten wordt of wel/niet met een dierproef gestart gaat worden niet voldoende zijn beschreven. U dient daarom, in het kader van vermindering, de go/no go momenten voor aanvang van het project vast te stellen en de criteria daarvoor ter goedkeuring voor te leggen aan de IvD.

4) In uw aanvraag geeft u aan gebruik te gaan maken van genetisch gemodificeerde dieren waarin specifieke genen uitgeschakeld zijn. Zodra bekend is wat de aard van de mutatie zal zijn, dient uw het ongerief van deze dieren in te schatten en de humane eindpunten voor deze dieren vast te stellen en dit af te stemmen met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om het ongerief van dieren zoveel mogelijk te beperken.

5) U heeft in uw aanvraag humane eindpunten gedefinieerd voor dieren die een anafylactische shock ervaren. Indien een dier veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid vertoont die meer dan 90 minuten aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en gaat u het desbetreffende dier doden. De CCD vraagt zich af of inderdaad pas na 90 minuten bepaald kan worden of herstel van de anafylactische shock niet waarschijnlijk is. Om te voorkomen dat dieren onnodig lang ongerief hebben, dient u voor aanvang van het project goed naar deze criteria te kijken en deze af te stemmen met de IvD. Hierbij dient met name aandacht besteed te worden aan de duur van de observatieperiode die nodig is om te bepalen of herstel van de anafylactische shock wel/niet waarschijnlijk is.

Wij nemen de rest van het 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 het colofon.

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

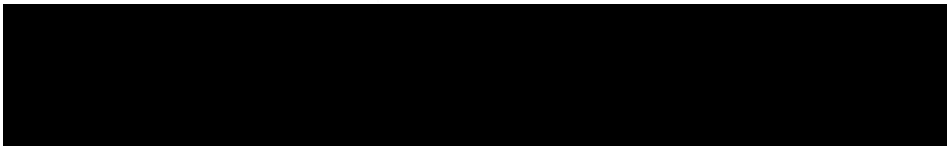
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

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
Postbus: 12007
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 29 oktober 2015 tot en met 01 oktober 2020, voor het project 'Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën' met aanvraagnummer AVD108002015212, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat de CCD niet overtuigd is van de onmogelijkheid om zowel mannelijke als vrouwelijke dieren te gebruiken voor dit project. Daarnaast is de CCD van mening dat de criteria voor de go/ no go momenten en de keuze voor de immuun modulerende voedingssupplementen, de toedieningswijze van de immunotherapie en de allergenen niet voldoende zijn uitgewerkt.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 12 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 12 augustus 2015 en de aangepaste Niet-technische Samenvatting, zoals ontvangen bij digitale indiening op 28 oktober 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen per digitale indiening op 12 augustus 2015
 - d. Aanvullende informatie, zoals ontvangen bij digitale indiening op 08 oktober 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Muismodel voor voedselallergie	Muis	3200	Licht: 10% (sham sensibilisatie) Matig: 90%
Transfer studie	Muis	1600	Matig
Depletie studie	Muis	800	Licht: 10% (sham sensibilisatie) Matig: 90%
Donor studie	Muis	260	Licht

Voorwaarden

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

- 1) In een pilotstudie wordt vastgesteld of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. Deze pilotstudie kan parallel/ geïntegreerd aan de eerste studie met vrouwelijke dieren worden uitgevoerd. Indien er geen verschil in uitkomsten wordt gevonden, worden in alle dierproeven mannelijke en vrouwelijke dieren in evenredige aantallen gebruikt. Zo doende wordt voorkomen dat surplus dieren in voorraad moeten worden gedood.

De aanvrager moet de uitkomsten van de eerste onderzoeken waarbij beide geslachten gebruikt worden rapporteren aan de CCD. De uitkomst van deze eerste onderzoeken kan voor de CCD aanleiding geven om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten voor deze projectvergunning te wijzigen of in te trekken.

- 2) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de criteria op basis waarvan besloten wordt welke allergeen-specifieke therapie, toedieningswijze en immuun modulerende voedingssupplementen geselecteerd gaan worden voor aanvang van het project af te stemmen met de IvD.
- 3) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten voor aanvang van het project worden vastgesteld en dat de IvD instemt met de vastgestelde criteria.
- 4) De criteria voor het bereiken van de humane eindpunten dienen voor aanvang van het project met de IvD worden geoptimaliseerd. Hierbij dient met name aandacht besteed te worden aan de duur van de observatieperiode die nodig is om te bepalen of herstel van de anafylactische shock wel/niet waarschijnlijk is.
- 5) Het ongerief van eventueel te gebruiken knock-out muizen en de humane eindpunten voor deze dieren dienen voor aanvang van desbetreffende dierproeven te worden afgestemd met de IvD.
- 6) 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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.814.012
2. Titel van het project : Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergiën
3. Titel van de NTS : Optimalisatie van therapie voor voedselallergiën met voedingssupplementen

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: 12-06-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 17-06-2015
 anderszins behandeld: per email 15-07-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 26-06-2015 tot 14-07-2015
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 10-08-2015

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: 26-06-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Gezien het feit dat er al meerdere projecten bij de DEC gepasseerd zijn waar ook immunotherapie en voedselinterventie hebben plaatsgehad, klopt de zin "*De combinatie van allergeen-specifieke immunotherapie en een dieetinterventie is nog niet eerder getest in een diermodel*" niet. De DEC verzoekt u deze zin te verwijderen. Daarnaast mist de DEC hier juist de brug naar vorige projecten. Wat heeft voorgaand onderzoek opgeleverd, wat is er nog niet bekend (de witte vlek) en wat verwacht u met die onderzoek te bereiken (wat is de focus)? Graag nader toelichten.
- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af of het muismodel de juiste keuze voor dit project? Muizen zijn van zichzelf niet allergisch, maar worden allergisch gemaakt. Bij mensen komt allergie constitutioneel voor. Graag nader onderbouwen waarom dit dan toch het beste diermodel zou zijn.
- 3.2 Doel: De DEC raadt u aan het woord 'veilig' te vervangen door 'efficiënter en met minder bijwerkingen'. Nu wordt de indruk gewekt dat een safety studie wordt gedaan, maar bedoeld wordt 'minder bijwerkingen'.
- 3.3 Belang: Ook hier graag het woord 'veilig' vervangen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Ook hier graag het woord 'veilig' vervangen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U geeft aan dat parallel aan dit project humaan in vitro onderzoek plaatsvindt. Betekent dit ook dat u gedurende het experiment kijkt naar de werkzaamheid van de resultaten in de mens? Zo ja, op welke momenten zou dit plaatsvinden? En wordt het onderzoek aan de hand daarvan eventueel ook bijgesteld? Dit zou de studie ook deels translationeel maken. De DEC verzoekt u dit duidelijker weer te geven in het projectvoorstel. Tevens graag de relatie met de kliniek (consortium noemen) weergeven.
- 3.4 Onderzoeksstrategie, schema: Ook hier graag het woord 'veilig' vervangen.

Bijlage 1, 2 en 3:

- B. De dieren: De DEC begrijpt dat de prevalentie hoger is in vrouwen dan in mannen, maar wat is de prevalentie van allergie bij jongetjes en bij volwassen mannen en wordt dat dan later ook vertaald in het herhalen van de positieve bevindingen in mannelijke muizen? Graag toelichten. Daarnaast adviseert de DEC u het gebruik van alleen vrouwelijke muizen nader te motiveren.
- J. Humane eindpunten: De DEC adviseert u om hier aan te geven dat gedurende de periode dat er een shock kan optreden onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag in de gaten te houden.

- Datum antwoord: 14-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De achtergrondinformatie is uitgebreid en er is nu duidelijk toegelicht waarom het gekozen diermodel het beste model is.
- 3.2 Doel: Dit is aangepast als volgt: *"Het hoofddoel van dit project is het verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen. Tevens willen wij het werkingsmechanisme van de genoemde combinatie onderzoeken."*
- Op diverse plaatsen in het projectvoorstel is het woord 'veilig' vervangen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De aanvraag is aangepast als volgt: *"Om het werkingsmechanisme in de mens tevens uit te diepen zal parallel aan dit onderzoek in diermodellen, aanvullend humaan in vitro onderzoek worden uitgevoerd in een apart AiO project. De in vitro modellen zijn gebaseerd op combinaties van humane darmepitheelcellijnen en bloedcellen uit gezonde personen en allergische patiënten. Immuncellen verkregen van allergische patiënten zullen al dan niet in combinatie met darmepitheelcellen worden blootgesteld aan de voedingssupplementen, zodat er gekeken kan worden of deze supplementen effect hebben op de cellulaire response en wat het immunologische mechanisme is. De verkregen resultaten worden binnen het consortium besproken en kunnen bijdragen aan de verfijning en bijstellen van het onderzoek in diermodellen en in de toekomst ook aan de translatie van de strategie naar een klinische studie. De betrokkenheid van onderzoekers/artsen van het academisch ziekenhuis (UMC) met ervaring in voedselallergie biedt het consortium de mogelijkheid om de experimentele bevindingen uit het in vitro en dieronderzoek in de toekomst naar studies in de mens te vertalen."*

Bijlage 1, 2 en 3

- B. De dieren: De aanvraag is als volgt aangepast: *"Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (██████████). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in preklinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter (██████████). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekent dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van hetzelfde geslacht zijn. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag."*

Volgens Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOJ voor kankeronderzoek. Het

gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Dit is opgenomen in de projectaanvraag.

- J. Humane eindpunten: Hier is toegevoegd: "*Gedurende de periode dat er een anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden.*"

- 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 verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen. Daarnaast kan het bijdragen aan het ophelderen van het werkingsmechanisme van immunotherapie met voedingssupplementen. Voedselallergieën, veroorzaakt door eiwitten, zijn een belangrijk maatschappelijk probleem dat veel leed veroorzaakt voor mensen met deze vorm van allergie. Het toepassen van immunotherapie is een veelbelovende methode tegen deze vorm van voedselallergie, maar geeft momenteel nog te veel allergische bijwerkingen en is daarom nog niet geschikt voor

toepassing op de mens. Het door middel van fundamenteel wetenschappelijk onderzoek verbeteren van de effectiviteit van allergeen-specifieke immunotherapie en het verminderen van de bijwerkingen daarvan, alsmede het verwerven van inzicht in het werkingsmechanisme van immunotherapie en voedingssupplementen is daarom van groot belang. Deze fundamenteel wetenschappelijke studie, bestaande uit preklinische dier- en in vitro experimenten, zal niet direct leiden tot een effectievere behandeling van voedselallergieën, maar kan in de toekomst mogelijk bijdragen aan vervolgonderzoek en het testen van de genoemde strategie in een klinische studie.

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. Het ongerief in de eerste en derde bijlage is voor ongeveer 10% van de dieren als licht ingeschat vanwege de sham sensibilisatie. Deze dieren zullen geen allergische reactie krijgen. 90% Van de dieren zal matig ongerief ondervinden vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en vanwege de kort durende anafylactische reactie. Voor bijlage 3 geldt tevens dat het ongerief van de knock-out/depletie dieren pas wordt ingeschat wanneer bekend is welke receptoren of eiwitten geblokkeerd worden in het dier. Dit wordt voor aanvang van het experiment afgestemd met de IvD. In de tweede bijlage is het ongerief ingeschat als matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en voor de ontvangstdieren tevens vanwege de korte anafylactische reactie. Het ongerief in bijlage 4 is ingeschat als licht omdat de donordieren weinig tot geen behandelingen zullen ondergaan. 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. Bij de ontwikkeling van voedselallergieën spelen vele verschillende aspecten een rol,

zoals de immuuncellen in de darmen, de slijmvliezen in de mond, de huid en de cellen die in de bloedbaan voorkomen of in de klieren verblijven, waardoor het geheel een complex proces is. Vanwege de complexiteit is het niet mogelijk om het volledige project in vitro na te bootsen en zijn proefdieren noodzakelijk. Voorafgaand aan het project zal met behulp van cellijnen en primaire celkweken in vitro onderzoek worden gedaan naar de precieze werking van de voedingssupplementen (bijlage 1) en welke factor een rol speelt en dus interessant is om met behulp van een depletiestudie te onderzoeken (bijlage 3). Het onderzoek in bijlage 4, het in vitro testen van allergenen/allergeenstructuren en voedingscomponenten aan de hand van donormateriaal, kan ervoor zorgen dat een in vivo experiment (met meer ongerief voor het dier) niet nodig zal zijn.

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. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd. Voor bijlage 1, 2 en 3 geldt dat voor het berekenen van het aantal benodigde dieren statistische methoden worden toegepast. De berekeningen zijn gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. In bijlage 4 wordt het aantal dieren bepaald door de benodigde hoeveelheid donormateriaal om alle gewenste experimentele- en controle condities te testen.

In de eerste drie bijlagen wordt gebruik gemaakt van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat:

- Voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in preklinisch onderzoek om die reden mogelijk relevanter.
- Er minder variatie binnen een experiment is wanneer maar één geslacht gebruikt wordt, waardoor minder dieren nodig zijn.
- Vrouwelijke muizen minder de neiging hebben om te vechten, waardoor ze eenvoudiger gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.
- Er volgens leverancier Charles River een fokoverschot is van vrouwelijke C3H/HeO_uJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeO_uJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen.

Het geslacht van de donormuizen in bijlage 4 zal voor specifieke T cel reacties donormateriaal van vrouwelijke muizen verzameld worden, zodat het sensibiliseren vergelijkbaar verloopt en er een vergelijking gemaakt kan worden met de resultaten uit in vivo experimenten.

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. In dit project wordt gebruik gemaakt van muizen die gevoelig zijn voor voedselallergieën, waardoor deze muis een geschikte donor is voor o.a. allergeen-specifieke cellen die gebruikt

kunnen worden in een in vitro experiment en het effect van de therapie goed onderzocht kan worden. Vanwege jarenlange ervaring binnen de onderzoeksgroep is het te gebruiken model een verfijnd model met zo beperkt mogelijk ongerief.

Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden. Het is mogelijk dat de dieren na het challengen een anafylactische shock krijgen waarvan herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. In dat geval zullen dieren eerder gedood worden om het ongerief te beperken. De dieren zullen gezamenlijk gehuisvest worden.

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 effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen bestuderen, substantieel is en opweegt tegen het ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.

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 voornamelijk vrouwelijke muizen willen gebruiken. Er is voldaan aan de vereisten van verfijning en vermindering. Waar mogelijk worden eerst in vitro experimenten uitgevoerd. Bij ca. 80% van de dieren treedt, als gevolg van het frequent toedienen van stoffen met matig klinische verschijnselen en/of een anafylactische shock matig ongerief op. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het lichte tot 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.



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.
- 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 |
|------------|--------------------------------|
| 3.4.4.1 | Muismodel voor voedselallergie |

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.

Om de doelstelling van deze projectaanvraag te bereiken zullen wij hoofdzakelijk gebruik maken van het al ontwikkelde muismodel voor voedselallergie (Smit, 2012)(van Esch, 2013). In dit muismodel voor voedselallergie zullen wij kijken naar verschillende allergenen zoals pinda en het koemelk eiwit wei. Met behulp van het voedselallergie model in de muis kunnen wij onderzoeken welk type behandeling het meest geschikt is om de acute allergische response te verminderen en/of lange termijn bescherming tegen de allergie te bevorderen. Om de effectiviteit en de veiligheid te bepalen zullen wij voornamelijk gebruik maken van klinische parameters om de mate van de allergische response na een challenge vast te stellen. Voorbeelden hiervan zijn de acute zwelling in de huid van het oor na injectie van het allergeen, het meten van lichaamstemperatuur daling na challenge (anafylaxie) en het geven van een score gebaseerd op

uiterlijke symptomen van anafylaxie. Om ook te kijken wat er mechanistisch gebeurt, zullen wij naast klinische parameters ook kijken naar cellulaire en humorale parameters die we meten in bloed en organen. Voorbeelden hiervan zijn stoffen zoals histamine (Finkelman, 2007) die vrijkomen na mast cel degranulatie in het serum, antigeen-specifieke antilichamen in het serum en cellen geïsoleerd uit lymf organen en beenmerg. Het voedselallergie model bestaat uit drie verschillende fasen: in de eerste fase worden de naïeve dieren gesensibiliseerd met een oplossing van het allergeen in PBS met daaraan toegevoegd een adjuvant (bijv. cholera toxine). Door herhaaldelijke toediening van deze oplossing ontwikkelen de dieren een allergie tegen het specifieke allergeen. In de tweede fase van het experiment worden de dieren herhaaldelijk behandeld met het allergeen (immunotherapie) om de reactie van het immuunsysteem te veranderen. Deze immunotherapie kan worden gecombineerd met een dieetinterventie met als doel het proces van tolerantie inductie te ondersteunen. In de derde fase van het experiment worden de behandelde dieren blootgesteld aan een (hoge) test dosering van het allergeen om de effectiviteit van de therapie vast te stellen. In niet-behandelde dieren treedt na blootstelling anafylaxie op en deze reactie is naar verwachting in mindere mate aanwezig in dieren die immunotherapie hebben ondergaan.

Smit J.J. et al. Contribution of Classic and Alternative Effector Pathways in Peanut-Induced Anaphylactic Responses, Plos One, 2012.

van Esch B.C.A.M et al. Interlaboratory evaluation of a cow's milk allergy mouse model to assess the allergenicity of hydrolysed cow's milk based infant formulas, Toxicology Letters, 2013.

Finkelman F.D. et al. Anaphylaxis: lessons from mouse models, J Allergy Clin Immunol, 2007.

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.

Vanaf de start van het experiment, de sensibilisatie fase, zullen de dieren minimaal 5 en maximaal 8 keer per orale gavage een oplossing van allergeen plus een adjuvant (bijv. cholera toxine) binnen krijgen (één of meerdere gavages per week). Een alternatieve sensitizatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant. Vervolgens krijgen de dieren tijdens de therapie fase gedurende 2-4 weken herhaaldelijk een behandeling met het allergeen in PBS (minimaal 1x per week, maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute). Na de therapie fase volgt een korte periode van rust waarna de dieren worden blootgesteld aan de challenge die via verschillende toedieningsroutes gegeven kan worden. Indien gewenst kan na de challenge lichaamstemperatuur worden gemeten met een rectale thermometer op minimaal 1 en maximaal 8 tijdstippen. De challenge in het oor wordt uitgevoerd onder anesthesie. De dieren zijn maximaal 1 minuut onder anesthesie per meetmoment (maximaal 2 meetmomenten). Indien gewenst kan op bepaalde tijdstippen tijdens het experiment bloed worden afgenomen en kunnen feces monsters worden verzameld. De dieren worden tijdens de feces verzameling voor korte periode apart gehuisvest. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Een negatieve controle groep wordt sham gesensibiliseerd en sham behandeld, een positieve controle groep wordt met allergeen gesensibiliseerd en sham behandeld. Afhankelijk van de onderzoeksvraag, kan er ook gekozen worden voor een tolerante controlegroep. Deze groep krijgt het allergeen zonder adjuvant toegediend. Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de kwaliteit van het allergiemodel te waarborgen. Daarnaast wordt er voor iedere behandelgroep op een experimenteel dieet een vergelijkbare groep meegenomen op controledieet. Het gekozen aantal groepen is wat minimaal nodig is om de juiste vergelijkingen te kunnen maken en om betrouwbare resultaten te krijgen. De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van een relevante parameter. Per experiment kan bepaald worden welke parameter het meest relevant is. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de acute allergische response in het oor (oorzwellings), of antilichaam waardes in het serum. Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte dus op de aantallen die uit de

powerberekening komen. Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling (PE=pinda eiwit; SCIT=subcutane immunotherapie; OIT=orale immunotherapie; ■■■ dieet= fructo-oligosacchariden verrijkt dieet):

A n=6	PBS sensibilisatie	sham therapie+controle dieet	PE challenge
B n=8	PE sensibilisatie	sham therapie+controle dieet	PE challenge
C n=8	PE sensibilisatie	SCIT PE (s.c. 10 ug)+controle dieet	PE challenge
D n=8	PE sensibilisatie	OIT PE (i.g. 1.5 mg)+ controle dieet	PE challenge
E n=8	PE sensibilisatie	Sham therapie+ ■■■ dieet	PE challenge
F n=8	PE sensibilisatie	SCIT PE (s.c. 10 ug)+■■■ dieet	PE challenge
G n=8	PE sensibilisatie	OIT PE (i.g. 1.5 mg)+ ■■■ dieet	PE challenge

B. De dieren

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

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het voedselallergie model is de muis, bijvoorbeeld van de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie (Smit, 2012). Het model voor voedselallergie is een model waar al jaren mee wordt gewerkt binnen de betrokken afdelingen (Smit 2012, Schulz 2012, Van den Elsen 2013, Schouten 2010, van Esch 2011, Schouten 2010). De effecten zijn robuust en zowel in mannelijke als vrouwelijke muizen te zien (Smit, 2012, de Theije 2013).

Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (■■■). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in pre-klinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter (■■■). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekend dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van hetzelfde geslacht zijn. Volgens leverancier Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOuJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken binnen het voedselallergie model is 3200 over een periode van 5 jaar. Naar verwachting zullen we twee allergenen/allergeen-structuren, vier diëten en twee vormen van therapie testen met verschillende doseringen. Per jaar verwachten wij dat er per allergeen 4 studies uitgevoerd kunnen worden om de diëten en therapievormen te testen. Per experiment zullen er ongeveer 80 muizen nodig zijn om alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen. Voor dit type dierexperiment komt dit uit op 5 jaar x 2 allergenen/allergeen-structuren x 4 studies x 80 muizen per studie=3200 muizen voor dit type experiment.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
de Theije C.G.M. et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice, Neuropharmacology, 2013.
[REDACTED]
[REDACTED]

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging: Het voedselallergie model is ontworpen om de ontwikkeling en modulatie van voedselallergieën te kunnen onderzoeken en vanwege de complexiteit is het niet mogelijk dit volledig in vitro na te bootsen. Daarnaast is het mechanisme van tolerantie inductie aan de hand van immunotherapie en een dieetinterventie nog niet bekend en om dit proces te onderzoeken hebben wij een compleet organisme nodig. De effectiviteit van de verschillende dieetcomponenten zal voorafgaand aan een dierexperiment worden getest met behulp van in vitro testen. Dit om er zeker van te zijn dat de gekozen componenten de potentie hebben om in een dierexperiment het beoogde effect te laten zien. **Vermindering:** Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald (zie uitleg punt A). Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. **Verfijning:** De keuze om deze muissoort te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft de allergene dosering die effectief is maar geen allergische bijwerkingen veroorzaakt tijdens de immunotherapie fase. Het ongerief wat kan optreden na een challenge kunnen we zoveel mogelijk

beperken, maar niet voorkomen. Deze test is noodzakelijk om de effectiviteit van de gekozen behandeling vast te stellen.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer het welzijn wordt aangetast door een allergische reactie, worden de dieren gedurende deze periode goed in de gaten gehouden en worden lichaamstemperatuur en mobiliteit/gedrag gemeten. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in lichaamstemperatuur of gedragsverandering, wordt besloten het dier te doden.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress
- Symptomen van anafylaxie na blootstelling aan een hoge dosering van het allergeen (challenge)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Vanwege de frequentie van de behandelingen tijdens de immunotherapie fase kunnen zij stress ervaren. Wanneer de dieren maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute, worden behandeld zullen de dieren relatief vaak in een korte periode (2-4 weken) gefixeerd moeten worden en een injectie of gavage moeten ondergaan.
- Kenmerken voor de anafylactische reactie zijn een tijdelijke daling van lichaamstemperatuur en een verminderde mobiliteit en/of alertheid. Deze reactie houdt ongeveer 60 minuten aan.

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

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
- Wanneer anafylaxie optreedt na challenge worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en wordt de lichaamstemperatuur gemeten met een rectale thermometer. Daarnaast wordt gekeken naar mobiliteit/gedrag en alertheid van het dier om de toestand te kunnen inschatten. Wanneer het dier een vooraf vastgestelde grens in lichaamstemperatuurdaling bereikt, wordt het dier op een warmtematje gelegd om het herstel te bevorderen.

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 humaan eindpunt kan van toepassing zijn na challenge wanneer de dieren een dusdanige anafylactische shock ervaren dat herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. Het volgende houden wij aan als humaan eindpunt bij anafylaxis: wanneer veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid meer dan 90 min aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en wordt het dier gedood. Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de

muizen in de gaten te houden.

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

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat tussen de 5 en 10% van de dieren kans maakt om na challenge 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.

Binnen dit type dierexperiment zal het ongerief van ongeveer 10% van de dieren worden geclassificeerd als licht. Deze dieren worden namelijk sham gesensibiliseerd (met PBS) en zullen geen allergische reactie kunnen ondervinden. Het ongerief van de overige 90% van de dieren kan worden geclassificeerd als matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en vanwege de kort durende anafylactische reactie. De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie.

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.

De dieren die worden gebruikt in dit type dierexperiment zullen na afloop van het experiment worden gedood vanwege de noodzaak om organen en bloed te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium.

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

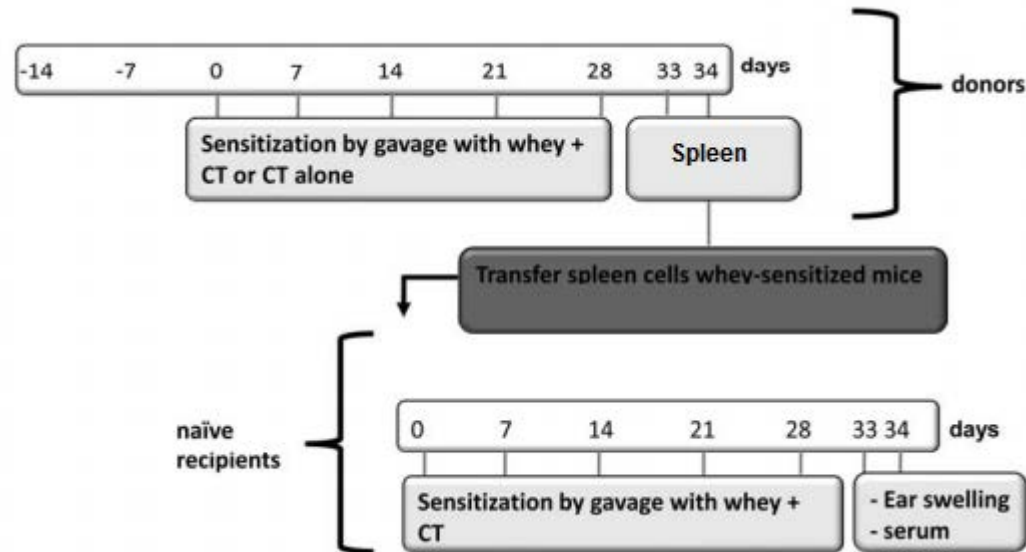
Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

bijvoorbeeld cellulaire veranderingen in het immuunsysteem van het donordier, zal dit effect ook te zien zijn in een (niet behandeld) ontvangstdier na inspuiten van deze cellen.

Voor de transferstudies gebruiken we donordieren, waarvan materiaal (zoals milt, serum, celtypes) wordt verzameld, en ontvangstdieren die worden geïnjecteerd met het materiaal. Een schematisch overzicht van een mogelijke transferstudie is te zien in figuur 1. In deze studie hebben de allergische donordieren een diëetinterventie gehad en wordt onderzocht of een beschermend effect is over te brengen via een transfer van miltcellen naar naïeve ontvangstdieren die vervolgens worden gesensibiliseerd en een challenge ondergaan.

Donormateriaal, zoals een miltsuspensie of serum, van het donordier kan worden overgebracht in het ontvangstdier. Het ontvangstdier is naïef voor het allergeen en kan indien gewenst na de transfer worden gesensibiliseerd óf direct worden blootgesteld aan een (hoge) test dosering van het allergeen om de effectiviteit van de therapie van het donordier vast te stellen. Het transfermateriaal van niet-behandelde donordieren zal in het ontvangstdier, na blootstelling, anafylaxie veroorzaken en naar verwacht zal dit in mindere mate aanwezig zijn bij dieren die het transfermateriaal van immunotherapie donordieren hebben ontvangen. Acute zwelling in de huid van het oor na injectie van het allergeen, het meten van lichaamstemperatuur, het bepalen van de klinische score, het meten van mast cel degranulatie (mMCP-1 levels) en antilichaam levels in serum na verschillende challenges, kunnen gebruikt worden als parameters. Wanneer de allergische response is verlaagd, kan men vaststellen dat er een systemische verandering heeft plaatsgevonden. Met behulp van deze transfer studies kunnen wij onderzoeken welk type behandeling bepaalde systemische veranderingen teweeg brengt.



Figuur 1. Voorbeeld van een schematisch overzicht van een transfer studie (Schouten 2010).

Janecharut T et al, Effects of heterologous helminth infections on passive transfer of immunity using a mouse monoclonal IgE antibody against Schistosoma japonicum Parasitology Research, 1991.

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.

In deze proef zijn er twee verschillende groepen dieren: donordieren en ontvangstdieren.

Donordieren:

- Sensitisatie: het donordier zal worden gesensibiliseerd met het allergeen, door het allergeen oraal toe te dienen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Een alternatieve sensitisatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. alum). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie.
- Therapie: tijdens twee tot vier weken kan de donormuis immunotherapie met het specifieke allergeen krijgen. Dit is een herhaaldelijke behandeling met het allergeen in PBS. Dit kan subcutaan, intragastraal, sublinguaal, epidermaal of een andere route van toediening zijn. De therapie zal 1-5 keer per week gegeven worden afhankelijk van de toedieningsroute.
- Challenge: nadat de donordieren zijn gesensibiliseerd en immunotherapie hebben ondergaan, kunnen zij één of meerdere malen oraal, intraperitoneaal of intradermaal gechallengeed worden met het specifieke allergeen om te meten of de behandeling de acute allergische response heeft verminderd.
- Dieet: de donormuis kan een specifieke dieetinterventie krijgen. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.
- Transfer: na de therapie fase of na de challenge fase wordt materiaal van de donormuizen verzameld, dit kan bijvoorbeeld een cel populatie, weefsel suspensie, eiwit of serum zijn. De challenge is optioneel en dient om te meten of de donordieren een verminderde allergische response hebben na het ondergaan van een bepaalde behandeling. Vervolgens kan het donormateriaal worden overgebracht in de ontvangstdieren. De techniek die zal worden toegepast hangt af van de keuze van materiaal en zal plaatsvinden na sectie van de donordieren.

Ontvangstdieren:

- Transfer: het ontvangstdier zal donormateriaal van het donordier ontvangen via bijvoorbeeld een intraveneuze injectie.
- Sensitisatie: het ontvangstdier kan worden gesensibiliseerd met het allergeen, door het allergeen oraal toe te dienen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Een alternatieve sensitisatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. alum). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie.
- Challenge: nadat de ontvangstdieren zijn gesensibiliseerd en immunotherapie hebben ondergaan, kunnen zij één of meerdere malen oraal, intraperitoneaal of intradermaal gechallengeed worden met het specifieke allergeen om te meten of de transfer de acute allergische response heeft verminderd.
- Dieet: het ontvangstdier kan een specifieke dieetinterventie krijgen. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen, zodat het experiment optimale uitkomsten oplevert. Het minimum aantal dieren wordt bepaald door de opzet van het experiment en is berekend met een sample size berekening per groep. Voor de donordieren zal rekening gehouden worden met de hoeveelheid materiaal nodig om een effect te induceren in het ontvangstdier. Voor de ontvangstgroep is de gekozen parameter in de sample size berekening de belangrijkste parameter voor de allergische response zoals

de acute allergische response na intradermale challenge in het oor. Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groeps grootte op de aantallen die uit de powerberekening komen.

Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling, het schematische overzicht van dit voorbeeld is te zien in figuur 1. (Whey=wei eiwit; SCIT=subcutane immunotherapie; OIT=orale immunotherapie; ■■■ dieet= fructo-oligosacchariden verrijkt dieet):

Donordieren:

A:n=6	PBS sensitisatie	sham therapie+controle dieet
B:n=8	PBS sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+controle dieet
C:n=8	PBS sensitisatie	Sham therapie+ ■■■ dieet
D:n=8	PBS sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+ ■■■ dieet
E:n=8	Whey sensitisatie	sham therapie+controle dieet
F:n=8	Whey sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+ controle dieet
G:n=8	Whey sensitisatie	Sham therapie+ ■■■ dieet
H:n=8	Whey sensitisatie	OIT Whey (i.g. 1.5 mg)+ ■■■ dieet

Ontvangstdieren:

A n=6	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
B n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
C n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
D n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
E n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
F n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
G n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges
H n=8	Whey sensitisatie	Controle diet	Whey challenges

B. De dieren

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

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in het voedselallergie model is de muis, bijvoorbeeld van de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie (Smit, 2012). Het model voor voedselallergie is een model waar al jaren mee wordt gewerkt binnen de betrokken afdelingen (Smit 2012, Schulz 2012, Van den Elsen 2013, Schouten 2010, van Esch 2011, Schouten 2010). De effecten zijn robuust en zowel in mannelijke als vrouwelijke muizen te zien (Smit, 2012, de Theije 2013).

Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (■■■ ■■■). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in pre-klinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter (■■■ ■■■ ■■■). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekent dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van

hetzelfde geslacht zijn. Volgens leverancier Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOuJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken voor de transfer studies is 1600 over een periode van 5 jaar. Naar verwachting zullen we twee allergenen/allergeen-structuren testen en zullen we binnen een experiment variëren met vier diëten en twee vormen van therapie met verschillende doseringen. Per experiment zullen er ongeveer 160 muizen nodig zijn om voor zowel de donorgroep als de ontvangstgroep alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen en de diëten en vormen van therapie te testen (zie voorbeeld groepsindeling). Het overbrengen van donormateriaal naar ontvangstmuizen gebeurt over het algemeen 1 op 1: één donormuis levert celsuspensies of serum voor één ontvangstmuis. Voor dit type dierexperiment komt dit uit op 5 jaar x 2 allergenen/allergeen-structuren x 160 muizen per studie= 1600 muizen voor dit type experiment.

[REDACTED]
Schulz V.J. et al. Aryl hydrocarbon receptor activation affects the dendritic cell phenotype and function during allergic sensitization, Immunobiology, 2013

[REDACTED]
de Theije C.G.M. et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice, Neuropharmacology, 2013.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen. **Vervanging:** Het voedselallergie model wat de basis vormt voor deze transfer studie is ontworpen om de ontwikkeling en modulatie van voedselallergieën te kunnen onderzoeken en vanwege de complexiteit is het niet mogelijk dit volledig in vitro na te bootsen. De resultaten van de studies met het muismodel voor voedselallergie (3.4.4.1) en de in vitro experimenten met primair materiaal (3.4.4.4) zullen de basis vormen voor het uitvoeren van een transfer experiment.

Wanneer een verandering is te zien in bijvoorbeeld regulatoire T cellen na een bepaalde therapeutische strategie met een dieet en immunotherapie in het muismodel voor voedselallergie, kan gekozen worden voor de transfer van deze factor om de functionaliteit uitgebreider te onderzoeken. Deze keuzes voorafgaand aan een transfer experiment zijn schematisch weergegeven in het figuur in het projectvoorstel bij 3.4.2. **Vermindering:** Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald (zie uitleg punt A). Ook wordt er vooraf bepaald hoeveel donordieren er nodig zijn om de juiste hoeveelheid transfer materiaal over te kunnen brengen in de ontvangstdieren en zo nodig wordt de groepsgrootte daarop aangepast. **Verfijning:** De keuze om deze muissoort te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft de allergeendosering die effectief is maar geen allergische bijwerkingen veroorzaakt tijdens de immunotherapie fase. Het ongerief wat kan optreden na een challenge kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen. Deze test is noodzakelijk om de effectiviteit van de gekozen behandeling vast te stellen.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer het welzijn wordt aangetast door een allergische reactie, worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en worden lichaamstemperatuur en mobiliteit/gedrag gemeten. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in lichaamstemperatuur of gedragsverandering, wordt besloten het dier te euthanaseren.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.V.T.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress
- Symptomen van anafylaxie na blootstelling aan een hoge dosering van het allergeen (challenge)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Vanwege de frequentie van de behandelingen tijdens de immunotherapie fase kunnen zij stress ervaren. Wanneer de dieren maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute, worden behandeld zullen de dieren relatief vaak in een korte periode (2-4 weken) gefixeerd moeten worden en een injectie of gavage moeten ondergaan.

- Kenmerken voor de anafylactische reactie zijn een tijdelijke daling van lichaamstemperatuur en een verminderde mobiliteit en/of alertheid. Deze reactie houdt ongeveer 60 minuten aan.

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

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
- Wanneer anafylaxie optreedt na challenge worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en wordt de lichaamstemperatuur gemeten met een rectale thermometer. Daarnaast wordt gekeken naar mobiliteit/gedrag en alertheid van het dier om de toestand te kunnen inschatten. Wanneer het dier een vooraf vastgestelde grens in lichaamstemperatuurdaling bereikt, wordt het dier op een warmtematje gelegd om het herstel te bevorderen.

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 humaan eindpunt kan van toepassing zijn na challenge wanneer de dieren een dusdanige anafylactische shock ervaren dat herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. Het volgende houden wij aan als humaan eindpunt bij anafylaxis: wanneer veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid meer dan 90 min aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en wordt het dier geëuthanaseerd. Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden.

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

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat tussen de 5 en 10% van de dieren kans maakt om na challenge het humane eindpunt te bereiken, mits de transfer van donormateriaal hier geen invloed op heeft.

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.

Binnen dit type dierexperiment zal het ongerief van de dieren worden geclassificeerd als matig in zowel de donordieren als de ontvangstdieren. Voor de donordieren is gekozen voor matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen. Zij zullen zelf geen anafylactische reactie ondergaan. Bij de ontvangstdieren is gekozen voor matig vanwege de anafylactische reactie die kort is en waarbij de dieren geen blijvende effecten ondervinden.

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.

Donordieren zullen worden geëuthanaseerd zodat donatie mogelijk is, ontvangstdieren zullen na afloop van een experiment worden geëuthanaseerd zodat onderzoek kan worden uitgevoerd in bloed en organen.

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.
- 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 |
|------------|-----------------|
| 3.4.4.3 | Depletie studie |

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 een depletie experiment is het mogelijk om bepaalde celtypes in het dier uit te schakelen zoals de regulatoire T cellen (Fyhrquist 2012). Ook is het mogelijk receptoren zoals de Tachykinin NK1 receptor (De Swert 2004), of eiwitten zoals IFN γ (Stern 2005) of MHCII () te blokkeren in het dier. Op deze manier kan in het model voor voedselallergie (zoals beschreven in 3.4.4.1) gekeken worden naar de specifieke bijdrage van deze factor in het mechanisme van de allergie en de therapie in combinatie met de dieetinterventie. De uitkomstparameters zijn gelijk aan de beschreven parameters van het voedselallergiemodel: voorbeelden hiervan zijn de acute zwelling in de huid van het oor na injectie van het allergeen, het meten van lichaamstemperatuur daling na challenge (anafylaxie) en het geven van een score gebaseerd op uiterlijke symptomen van anafylaxie. Naast klinische parameters kijken we ook

naar cellulaire en humorale parameters die we meten in bloed en organen. Voorbeelden hiervan zijn stoffen zoals histamine (Finkelman, 2007) die vrijkomen na mast cel degranulatie in het serum, antigeen-specifieke antilichamen in het serum en cellen geïsoleerd uit lymf organen en beenmerg.

Depletie kan in de praktijk bereikt worden door knockout muizen te gebruiken, zoals de IFN γ knockout BALB/c muizen (Stern 2005), maar ook door bijvoorbeeld specifieke antilichamen en/of antagonisten in het dier te spuiten die een specifieke target kunnen blokkeren, bijvoorbeeld met behulp van anti-CD25 of anti-CD4 (Schulz 2011). De invloed die het blokkeren heeft op de allergische response, kan inzicht geven in de rol van de target in het tot stand komen van de allergische reactie of de bescherming daartegen.

Fyhrquist N et al, Foxp3+ Cells Control Th2 Responses in a Murine Model of Atopic Dermatitis, Nature, 2012.

De Swert KO et al, The role of the tachykinin NK1 receptor in airway changes in a mouse model of allergic asthma, J Allergy Clin Immunol, 2004 .

Stern ME et al, Role of interferon-gamma in a mouse model of allergic conjunctivitis, Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005.

Finkelman FD et al. Anaphylaxis: lessons from mouse models, J Allergy Clin Immunol, 2007.

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.

Voorafgaand aan de studie kunnen bepaalde factoren in de muis geblokkeerd worden door middel van het injecteren van bijvoorbeeld een antilichaam, zoals anti-CD25 of anti-CD4. Een andere optie is dat er knockout muizen worden gebruikt die genetisch gemuteerd zijn. Vanaf de start van het experiment, de sensibilisatie fase, zullen de dieren minimaal 5 en maximaal 8 keer per orale gavage een oplossing van allergeen plus een adjuvant (bijv. cholera toxine) binnen krijgen (één of meerdere gavages per week). Een alternatieve sensitizatie methode is het inspuiten van het allergeen in combinatie met een adjuvant. Vervolgens krijgen de dieren tijdens de therapie fase gedurende 2-4 weken herhaaldelijk een behandeling met het allergeen in PBS (minimaal 1x per week, maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute). Na de therapie fase volgt een korte periode van rust waarna de dieren worden blootgesteld aan de challenge die via verschillende toedieningsroutes gegeven kan worden. Indien gewenst kan na de challenge lichaamstemperatuur worden gemeten met een rectale thermometer op minimaal 1 en maximaal 8 tijdstippen. De challenge in het oor wordt uitgevoerd onder anesthesie. De dieren zijn maximaal 1 minuut onder anesthesie per meetmoment (maximaal 2 meetmomenten). Indien gewenst kan op bepaalde tijdstippen tijdens het experiment bloed worden afgenomen en kunnen feces monsters worden verzameld. De dieren worden tijdens de feces verzameling voor korte periode apart gehuisvest. Wanneer een dieetinterventie van toepassing is bij een specifiek experiment, kunnen de dieren op een vooraf vastgesteld tijdstip van een controle dieet naar een experimenteel dieet worden gezet.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen, zodat het experiment optimale uitkomsten oplevert. Het minimum aantal dieren wordt bepaald door de opzet van het experiment en is berekend met een sample size berekening per groep. Per experiment wordt gekozen voor de belangrijkste parameter. Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groeps grootte op de aantallen die uit de powerberekening komen.

Ter verduidelijking een voorbeeld studie met bijbehorende groepsindeling, in deze studie kan de functionele rol van de regulatoire T cellen worden bestudeerd door deze cellen uit te schakelen met behulp van een anti-CD25 antilichaam. (PE=pinda eiwit; OIT=orale immunotherapie; ■■■ dieet= fructo-oligosacchariden verrijkt dieet; anti-CD25 mAb= anti-cd25 monoonaal antilichaam; anti-GL113 mAb =controle monoonaal antilichaam):

A n=6	PBS sensitisatie	sham therapie	+controle dieet	PE challenge
B n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	sham therapie	+controle dieet	PE challenge
C n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	sham therapie	+controle dieet	PE challenge
D n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ controle dieet	PE challenge
E n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ controle dieet	PE challenge
F n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	Sham therapie	+ [REDACTED] dieet	PE challenge
G n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	Sham therapie	+ [REDACTED] dieet	PE challenge
H n=8	PE sensitisatie + anti-GL113 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ [REDACTED] dieet	PE challenge
I n=8	PE sensitisatie + anti-CD25 mAB	OIT PE (i.g. 1.5 mg)	+ [REDACTED] dieet	PE challenge

B. De dieren

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

Het type diersoort dat zal worden gebruikt in een knock-out studie is de muis waarbij een specifieke mutatie in het DNA geïmplementeerd is. Als controle kan de wild-type variant gebruikt worden. Voorbeelden van al bestaande knock-out muizenstammen zijn de MHC class II-deficiente ($A\beta^{\circ/\circ}$) muis, de DEREK muis [REDACTED] of de korte-keten vetzuur receptor GPR41-knockout muis (Trompette 2013). Er zullen geen nieuwe knock-out stammen worden ingezet binnen deze aanvraag. Voor de depletie studies waar gebruik wordt gemaakt van bijvoorbeeld antilichamen, gebruiken we de muis van bijvoorbeeld de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf.

Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie ([REDACTED]). Het model voor voedselallergie is een model waar al jaren mee wordt gewerkt binnen de betrokken afdelingen ([REDACTED]). De effecten zijn robuust en zowel in mannelijke als vrouwelijke muizen te zien ([REDACTED]).

Wij kiezen voor het gebruik van alleen vrouwelijke muizen, o.a. omdat voedselallergie meer voorkomt in vrouwen dan in mannen op volwassen leeftijd (Kelly [REDACTED]). De vorm van immunotherapie die we onderzoeken wordt over het algemeen toegepast bij (jong) volwassenen met een persistente allergie en niet bij kinderen. Voor de vertaling naar de mens in de toekomst, is het gebruik van vrouwelijke muizen in pre-klinisch onderzoek daarom mogelijk relevanter ([REDACTED]). Er zal minder variatie zijn binnen een experiment als er maar één geslacht gebruikt wordt, wat betekent dat er in totaal minder muizen nodig zijn. Daarnaast hebben vrouwelijke muizen minder de neiging om te vechten en is het huisvesten van de muizen eenvoudiger als ze allemaal van hetzelfde geslacht zijn. Volgens leverancier Charles River is er een fokoverschot van vrouwelijke C3H/HeOuJ muizen, vanwege de grote afname van mannelijke C3H/HeOuJ voor kankeronderzoek. Het gebruik van alleen vrouwelijke muizen in het allergieonderzoek kan daarom juist helpen dit fokoverschot terugdringen. Het vergelijken van geslachten en/of leeftijden is niet het doel van dit project, maar we willen erkennen dat het relevant is om de meest optimale combinatie van immunotherapie en dieetinterventie uiteindelijk toe te passen op beide geslachten proefdieren en zullen dit overwegen als de tijd en middelen dit toelaten binnen deze projectaanvraag.

Het aantal dieren dat wij verwachten te gebruiken voor de depletie studies is 800 over een periode van 5 jaar. Naar verwachting zullen we twee allergenen/allergeen-structuren testen en zullen we binnen een experiment variëren met vier diëten en twee vormen van therapie met verschillende doseringen. Per experiment zullen er ongeveer 80 muizen nodig zijn om alle controle- en behandelgroepen mee te kunnen nemen en de diëten en vormen

van therapie te testen (zie voorbeeld van groepsindeling). Voor dit type dierexperiment komt dit uit op 5 jaar x 2 allergenen/allergeen-structuren x 80 muizen per studie= 800 muizen voor dit type experiment.

[REDACTED]
Trompette A et al, Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. Nature medicine. 2013

[REDACTED]
de Theije C.G.M. et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent impaired social behaviour and normalize brain dopamine levels in food allergic mice, Neuropharmacology, 2013.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

Vervanging: Bij deze depletie studies wordt gekeken naar het effect van het blokkeren van één specifieke factor op het functioneren van het complete immuunsysteem tijdens voedselallergie. Vanwege de complexiteit is het niet mogelijk het gehele allergie proces in vitro na te bootsen. De immuun cellen in de darmen, de slijmvliezen in de mond, de huid, maar ook de cellen die in de bloedbaan voorkomen of in de lymph organen verblijven, spelen allemaal een rol. De complexiteit van het geheel kan tot dusver nog niet worden nagebootst in een alternatief model en daarom is het gebruik van proefdieren noodzakelijk. Vooraf kan in vitro onderzocht worden welke factor een rol speelt en dus interessant is om met behulp van een depletiestudie te onderzoeken.

Daarnaast zal de kennis verkregen uit het voedselallergiemodel zelf en ook resultaten uit de transferstudie essentieel zijn om een depletiestudie te onderbouwen (zie ook schema projectvoorstel 3.4.2). **Vermindering:** Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de juiste vergelijkingen maken zodat we optimale uitkomsten kunnen behalen, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening. Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groeps grootte exact berekenen. **Verfijning:** De keuze om deze muissoort(en) te gebruiken binnen deze proefopzet is onderbouwd bij punt B en daarnaast hebben wij de mate van ongerief binnen het model zo veel mogelijk beperkt door kennis uit eerdere (pilot) experimenten te gebruiken wat betreft de allergeendosering die effectief is maar geen allergische bijwerkingen veroorzaakt tijdens de immunotherapie fase. Het ongerief wat kan optreden na een challenge kunnen we zoveel mogelijk beperken, maar niet voorkomen. Deze test is noodzakelijk om de effectiviteit van de gekozen behandeling vast te stellen.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Wanneer het welzijn wordt aangetast door een allergische reactie, worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en worden lichaamstemperatuur en mobiliteit/gedrag gemeten. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in lichaamstemperatuur of gedragsverandering, wordt besloten het dier te euthanaseren. Voordat een bepaalde factor wordt geblokkeerd via bijvoorbeeld antilichamen zal eerst bestudeerd worden of het dier ongerief zal ondervinden van deze aanpassing.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress
- Symptomen van anafylaxie na blootstelling aan een hoge dosering van het allergeen (challenge)
- Defect in immuunsysteem

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Vanwege de frequentie van de behandelingen tijdens de immunotherapie fase kunnen zij stress ervaren. Wanneer de dieren maximaal 5x per week, afhankelijk van de gekozen administratieroute, worden behandeld zullen de dieren relatief vaak in een korte periode (2-4 weken) gefixeerd moeten worden en een injectie of gavage moeten ondergaan.
- Kenmerken voor de anafylactische reactie zijn een tijdelijke daling van lichaamstemperatuur en een verminderde mobiliteit en/of alertheid. Deze reactie houdt ongeveer 60 minuten aan.
- Het uitschakelen van bepaalde factoren in het immuunsysteem die bijdragen aan de ontwikkeling van allergie/induceren van tolerantie kan nadelige effecten hebben voor het dier.

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

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.
- Wanneer anafylaxie optreedt na challenge worden de dieren gedurende de shock periode goed in de gaten gehouden en wordt de lichaamstemperatuur gemeten met een rectale thermometer. Daarnaast wordt gekeken naar mobiliteit/gedrag en alertheid van het dier om de toestand te kunnen inschatten.

Wanneer het dier een vooraf vastgestelde grens in lichaamstemperatuurdaling bereikt, wordt het dier op een warmtematje gelegd om het herstel te bevorderen.

- Er zal allereerst gekeken worden of er eerdere studies zijn gedaan waarbij de gekozen factor is uitgeschakeld en wat voor effect dit had op het dier. Wanneer de uitkomst van een bepaalde depletie onzeker is, kunnen we het eerst testen in een pilot experiment met een beperkt aantal dieren.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Een humaan eindpunt kan van toepassing zijn na challenge wanneer de dieren een dusdanige anafylactische shock ervaren dat herstel niet waarschijnlijk wordt geacht. Het volgende houden wij aan als humaan eindpunt bij anafylaxis: wanneer veranderingen in gedrag/mobiliteit of alertheid meer dan 90 min aanhouden en/of het dier een lichaamstemperatuur onder de 30 graden Celsius bereikt, is het humane eindpunt van toepassing en wordt het dier geëuthanaseerd. Gedurende de periode dat er anafylactische shock zou kunnen optreden, zullen er onderzoekers aanwezig zijn om de temperatuur en het gedrag van de muizen in de gaten te houden.

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

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat tussen de 5 en 10% van de dieren kans maakt om na challenge het humane eindpunt te bereiken, mits de aard van de knock-out/depletie hier geen verdere invloed op heeft.

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.

Binnen dit het voedselallergie model zal het ongerief van ongeveer 10% van de dieren worden geclassificeerd als licht. Deze dieren worden namelijk sham gesensitiseerd (met PBS) en zullen geen allergische reactie kunnen ondervinden. Het ongerief van de overige 90% van de dieren kan worden geclassificeerd als matig vanwege de frequente toediening van stoffen met matig klinische verschijnselen en vanwege de kort durende anafylactische reactie.

De dieren ondervinden geen blijvende effecten van een allergische reactie. Het ongerief van de knock-out/depletie dieren dient te worden geschat wanneer bekend is wat de aard van de blokkade zal zijn. Dit zal worden afgestemd met de IvD voor aanvang van een experiment.

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.

De dieren die worden gebruikt in dit type dierexperiment zullen na afloop van het experiment worden gedood vanwege de noodzaak om organen en bloed te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium.

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.
- 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
		3.4.4.4	Donor studie

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.

Om mechanistische kennis te verkrijgen betreffende immuun-modulatie via voedingssupplementen kunnen *in vitro* experimenten van groot belang zijn. De werkzaamheid van deze voedingssupplementen, zoals meervoudig onverzadigde vetzuren (van den Elsen, 2013), prebiotica zoals oligosacchariden, probiotica en/of specifieke combinaties hiervan (Gourbeyre, 2011)(Schouten, 2009) kan bijvoorbeeld getest worden op humane cellijnen zoals de HT-29 darmepitheel cellijn en/of humane PBMCs (de Kivit, 2013). Zo kan er gekeken worden of de effecten die in het muismodel voor voedselallergie naar voren komen, ook te zien zijn bij humane cellijnen. Daarnaast kunnen primaire cellen zoals T cellen en dendritische cellen (DC) uit donordieren worden gebruikt om de werkzaamheid en het mechanisme te onderzoeken in een *in vitro* setting. Als uitleesparameter kan er bijvoorbeeld gekeken worden naar het percentage regulatoire T cellen

wat in de kweek aanwezig is na blootstelling aan de voedingscomponenten. Een ander voorbeeld van een uitleesparameter is de proliferatie van T cellen of de productie van cytokines door T cellen die worden geassocieerd met tolerantie. Voorbeelden van materiaal wat uit donordieren kan worden geïsoleerd zijn beenmerg cellen, darmepitheel (organoids), serum eiwitten of immuun cellen uit bloed of organen. Voor dit type experiment zijn kleine hoeveelheden dieren nodig. Waar mogelijk wordt ernaar gestreefd dat donormateriaal wordt verkregen uit surplus dieren of dieren die bijvoorbeeld in een ander experiment een controle dier waren.

Ter verduidelijking een voorbeeld van een *in vitro* experiment waar gebruik wordt gemaakt van donormateriaal: de DC/T cel interactie assay (Smit, 2015). De mate van allergeniciteit van een toegevoegd allergeen wordt bepaald door te bestuderen hoe DCs het allergeen presenteren aan naïeve T cellen en welke type T cellen daarna te vinden zijn in de kweek. Daarnaast kan een *in vitro* model worden gebruikt om te begrijpen wat het effect van dieetcomponenten is op deze interactie tussen DCs en T cellen. Dendritische cellen kunnen in dit model tegelijkertijd worden blootgesteld aan allergenen en verschillende voedingscomponenten met een immuun-modulerende werking. Wanneer veranderingen optreden in T cel populaties en/of de productie van cytokines kan dit een aanwijzing zijn voor het werkingsmechanisme van de componenten in een *in vivo* experiment. Voor het verkrijgen van precursor dendritische cellen is beenmerg van naïeve muizen nodig. Om allergeen-specifieke T cellen te krijgen, worden bijvoorbeeld de milt of lymfeknopen van gesensibiliseerde muizen gebruikt om T cellen uit te isoleren. Het sensibiliseren van donordieren vindt plaats door het allergeen in te spuiten in combinatie met een adjuvant (zoals alum). Een alternatieve sensibilisatie methode is het oraal toedienen van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie. Ook andere celtypen naast T cellen en DCs kunnen worden gebruikt (mast cellen, neutrofielen etc) om bepaalde interacties tussen het immuunsysteem en het allergeen te bestuderen.

Ten slotte kan het serum van gesensibiliseerde muizen die geen therapie hebben ondergaan een belangrijke bron vormen voor allergeen-specifieke antilichamen zoals IgE, IgG1, IgG2a en IgA. Dit serum kunnen we gebruiken in bijvoorbeeld een ELISA om een titratie curve te maken en aan de hand daarvan antilichaam concentraties in serum samples van de behandelde dieren te meten.

Van den Elsen LW et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. Clin Exp Allergy. 2013

Gourbeyre P et al, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. J Leukoc Biol. 2011

Schouten B et al, Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. J Nutr. 2009

de Kivit S et al, Intestinal Epithelium-Derived Galectin-9 Is Involved in the Immunomodulating Effects of Nondigestible Oligosaccharides. J Innate Immun. 2013

Smit JJ et al, Heterogeneous responses and cross reactivity between the major peanut allergens Ara h 1, 2,3 and 6 in a mouse model for peanut allergy. Clin Transl Allergy. 2015

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.

Bij binnenkomst is er een acclimatisatie periode, vervolgens zullen de dieren worden geëuthanaseerd om het donormateriaal te verzamelen (beenmerg, darmbiopten etc). Materiaal wat allergeen-specifiek moet zijn wordt verzameld nadat de muizen gesensibiliseerd zijn. Het sensibiliseren van donordieren vindt plaats door het allergeen in te spuiten in combinatie met een adjuvant (bijv. alum). Een alternatieve sensitisatie methode is het oraal toe doen van het allergeen in combinatie met een adjuvant (bijv. cholera toxine). Over een periode van vijf weken zal er een tot meerdere keren per week gesensibiliseerd worden met de allergeen-adjuvant combinatie. Dit kan ingespoten worden of oraal gedoseerd worden. Vervolgens worden de dieren gedood en worden de organen geïsoleerd.

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

Afhankelijk van het benodigde donormateriaal wordt bepaald hoeveel donordieren nodig zijn. Door ervaring met *in vitro* experimenten is bekend hoeveel

materiaal er maximaal uit één muis geïsoleerd kan worden. Aan de hand hiervan kan berekend worden hoeveel dieren er per experiment gebruikt dienen te worden. Voorafgaand aan het experiment zal bepaald worden welke experimentele- en controle condities er worden onderzocht en hoeveel cellen of weefsels daarvoor nodig zijn. We baseren de groepsgrootte dus hoofdzakelijk op de hoeveelheid donormateriaal wat nodig is om betrouwbare resultaten te krijgen. Het gebruik van dieren in dit type experiment zal zoveel mogelijk worden beperkt door waar mogelijk surplus dieren te gebruiken. Vanwege de aard van het experiment is het dus niet mogelijk een powerberekening uit te voeren om de groepsgrootte te bepalen.

Ter verduidelijking een voorbeeld situatie met bijbehorende groepen:

DC/T cel interactie assay:

Groep A: n=1-2 > deze naïeve muis(en) wordt(en) gebruikt om beenmerg te isoleren en hier worden vervolgens DCs uit gekweekt

Groep B: n=4-8 > deze muizen worden gebruikt om allergeen-specifieke T cellen te isoleren uit de milt nadat ze volgens het beschreven sensitisatie protocol allergisch zijn geworden voor het allergeen. De hoeveelheid experimentele- en controle condities in de assay bepaalt het exacte aantal donordieren dat nodig is in de allergische donorgroep.

B. De dieren

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

Het type diersoort dat zal worden gebruikt is de muis, bijvoorbeeld van de C3H/HeOuJ stam. De herkomst van de muizen is een geregistreerd fokbedrijf. Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel methoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. De C3H/HeOuJ muis, die wij voornamelijk zullen gebruiken, heeft een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem en is gevoelig voor de inductie van voedselallergie (Smit, 2012). Daarom is deze muis een geschikte donor voor bijvoorbeeld allergeen-specifieke cellen die gebruikt kunnen worden in een *in vitro* experiment. Het geslacht van de donormuizen is minder relevant wanneer bijvoorbeeld serum wordt verzameld of cellen uit naïeve dieren. Wanneer we geïnteresseerd zijn in specifieke T cel reacties is het raadzaam om donormateriaal van vrouwelijke muizen te verzamelen, zodat het sensibiliseren vergelijkbaar verloopt en we de vergelijking kunnen maken met resultaten uit *in vivo* experimenten.

Wij verwachten dat de volgende typen donormateriaal nodig zullen zijn; serum (voor antilichamen), darmepitheel (organoids), beenmerg (voor o.a. DCs en mast cellen) en allergeen-specifieke T cellen uit de milt of de MLN.

Het benodigde serum om de titratiecurves te kunnen maken komt neer op 2 donordieren per *in vivo* experiment zoals deze zijn beschreven in 3.4.4.1 – 3.4.4.3.

Voor de *in vitro* assays verwachten wij 4 voedings-supplementen en/of combinaties daarvan te testen in combinatie met 2 allergenen/allergeenstructuren. Het aantal dieren per experiment komt neer op gemiddeld 2 naïeve dieren en gemiddeld 6 gesensibiliseerde dieren. We verwachten dat er 20 experimenten nodig zijn om de voedingscomponenten en allergenen/allergeen-structuren in verschillende combinaties en doseringen te testen. Het verzamelen van darmepitheel nemen we niet mee in de berekening, omdat het volstaat dat dieren gebruikt worden uit de *in vivo* experimenten zoals beschreven in 3.4.4.1 – 3.4.4.3. Dit geeft de volgende schatting voor het totaal aantal benodigde donordieren:

100 dieren voor serum donatie + (8 dieren x 20 *in vitro* experimenten) = 260 donordieren over een periode van 5 jaar

Smit J.J. et al. Contribution of Classic and Alternative Effector Pathways in Peanut-Induced Anaphylactic Responses, Plos One, 2012.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met in acht neming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen. **Vervanging:** het testen van allergenen/allergeenstructuren en voedingscomponenten aan de hand van donormateriaal in een *in vitro* assay kan ervoor zorgen dat bijvoorbeeld een (pilot) *in vivo* experiment niet nodig zal zijn. Deze aanpak zal kennis opleveren betreffende de potentie en het mechanisme van voedingssupplementen in het proces van tolerantie inductie. **Vermindering:** Het aantal dieren wordt bepaald door de opzet van het experiment, hiermee wordt bepaald hoeveel donormateriaal er nodig is om alle gewenste experimentele- en controle condities te testen. Het gebruik van deze donordieren zal leiden tot minder diergebruik in de *in vivo* experimenten omdat nieuwe condities eerst *in vitro* op donormateriaal getest kunnen worden. **Verfijning:** Muizen zijn geschikte proefdieren voor immunologisch onderzoek, omdat veel testmethoden en producten voorhanden zijn om het functioneren van het immuunsysteem te bepalen. We gebruiken een muizensoort in deze studies die een goed ontwikkeld mucosaal immuunsysteem heeft en ook gevoelig is voor de inductie van voedselallergie zodat allergeen-specifieke cellen kunnen worden gebruikt.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandeling zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de individuele dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt. Doordat er slechts een klein aantal donordieren per experiment nodig is, is er kans op solitaire huisvesting wanneer er bijvoorbeeld slechte één naïef dier nodig is om beenmerg te isoleren. Door rekening te houden met de planning, zal ervoor gezorgd worden dat solitaire huisvesting zoveel mogelijk wordt beperkt.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

NVT

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien zijn:

- Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Eventuele stress kan ontstaan door solitaire huisvesting.

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

- Om stress zoveel mogelijk te beperken wordt ernaar gestreefd dieren zo min mogelijk en zo kort mogelijk solitair te huisvesten.

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.

Doordat de donordieren relatief kort in een proef zitten en weinig tot geen behandelingen zullen ondergaan zal het cumulatief ongerief worden geclassificeerd als licht.

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.

Om het donormateriaal te verzamelen waar vervolgens experimenten mee worden gedaan *in vitro* is het nodig de dieren te doden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. 10800
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Universiteit Utrecht
- 1.3 Vul de titel van het project in. Dieetinterventies tijdens antigeen-specifieke immunotherapie voor voedselallergieën

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.

Voedselallergie is een belangrijk maatschappelijk probleem, dat voorkomt bij ongeveer 2-3% van de bevolking. Er is geen effectieve en veilige therapie beschikbaar. De huidige strategie bestaat uit het behandelen van symptomen en het vermijden van het allergeen in de dagelijkse voeding. De symptomen kunnen variëren van mild tot zeer ernstig en kunnen zelfs een fatale afloop hebben voor de patiënt. Immunotherapie is een behandelingsmethode voor voedselallergie waarbij patiënten worden blootgesteld aan gecontroleerde hoeveelheden van het allergeen om de reactiviteit van het immuunsysteem op het allergeen te verminderen. De allergenen kunnen via verschillende routes worden toegediend.

Recente resultaten van subcutane en orale behandelingen met allergenen in de mens zijn veelbelovend. Deze behandelingen gaan echter (te) vaak gepaard met allergische bijwerkingen, en/of lijken geen tolerantie te induceren die bescherming geeft op de lange termijn (Kostadinova, 2013)(Vickery, 2009)(Yeung, 2012). In onze eigen studies hebben we in een pinda- en koemelkallergiemodel subcutane en orale immunotherapie toegepast. Beide vormen van immunotherapie geven bescherming tijdens een acute allergische reactie en veroorzaken tevens veranderingen in het humorale en cellulair immuunsysteem. Hoewel we hebben vastgesteld dat immunotherapie de potentie heeft om de voedselallergie te onderdrukken op de korte termijn (desensibilisatie), kunnen wij nog niet vaststellen dat er bescherming op de lange termijn optreedt (tolerantie). Deze vraag in combinatie met het niet verlagen van alle allergische parameters (bijv. IgE) tijdens de therapie, zijn een belangrijke reden om het onderzoek voort te zetten en te onderzoeken of en hoe tolerantie inductie tijdens immunotherapie ondersteund kan worden en de kans op bijwerkingen wordt verlaagd. Om dit vraagstuk te kunnen beantwoorden hebben we ons verdiept in voedingssupplementen met immuunmodulerende werking en willen we onderzoeken of deze supplementen de immunotherapie kunnen optimaliseren.

In vitro studies, studies in diermodellen en studies in kinderen gericht op preventie van atopische dermatitis (Arslanoglu, 2012), suggereren dat toevoeging van voedingssupplementen in het dieet de effectiviteit van therapeutische benaderingen zoals immunotherapie zou kunnen verbeteren en het aantal bijwerkingen zou kunnen verminderen. Voorbeelden van deze voedingssupplementen zijn meervoudig onverzadigde vetzuren [redacted], prebiotica zoals oligosacchariden, probiotica en/of specifieke combinaties hiervan (Gourbeyre, 2011)([redacted]). Wij verwachten van dit onderzoek dat de immuunmodulerende werking van deze supplementen een positieve bijdrage kan leveren aan het proces van tolerantie inductie, wat uiteindelijk ervoor zorgt dat de allergische response op een efficiënte manier wordt onderdrukt en de patiënt langdurig wordt beschermd. Daarnaast verwachten wij dat de kans op bijwerkingen tijdens immunotherapie wordt vermindert.

Het is nog niet mogelijk om het proces van voedselallergie inductie en modulatie volledig na te bootsen door middel van alternatieve testen. Het proces is daarvoor te complex. In de afgelopen jaren zijn er diermodellen ontwikkeld waarin allergie en tolerantie inductie voor voedselallergenen bestudeerd kan worden ([redacted]?). De muizen worden allergisch gemaakt met behulp van adjuvantia, omdat de muizen geen spontane (meetbare) allergie kunnen ontwikkelen. Na het beschrijven sensibilisatie protocol laten de muizen manifestaties van voedselallergie zien zoals we die ook in patiënten

zien. Er ontwikkelen zich allergeen-specifieke T cellen, de hoeveelheid specifieke IgE antilichamen neemt toe, er is mest cel degranulatie na challenge meetbaar en er kan een anafylactische reactie gemeten worden aan de hand van lichaamstemperatuur en klinische symptomen (LI 2000-1). Hierdoor is dit model uitermate geschikt om te kijken naar therapeutische mogelijkheden voor het behandelen van voedselallergie. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de immunotherapie in combinatie met de immuunmodulerende voedingssupplementen kan alleen in de muis doordat het gebruik van weefsels noodzakelijk is.

Tijdens het opstellen van het projectvoorstel om fondsen te werven is er een uitgebreide literatuur screening gedaan om vast te stellen welke experimenten al zijn uitgevoerd in het immunotherapie veld en welke vragen nog beantwoord dienen te worden voordat de strategie de stap zou kunnen maken naar de kliniek. Het testen van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van de genoemde therapiecombinatie in een diermodel en het onderzoeken van het mechanisme zal hieraan bijdragen. Vanwege het grote aantal partners wat betrokken is bij dit project en hun uitgebreide netwerk en samenwerkingsverbanden, kunnen wij vaststellen dat de beschreven strategie in deze aanvraag nieuw is. Betrokken partners bij dit project zijn o.a. Universiteit Utrecht, JMC Utrecht, Danone/Nutricia Research en TNO. Het project wordt gefinancierd door het STW open technologie programma.

Vickery BP et al. Immunotherapy in the treatment of food allergy: focus on oral tolerance. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009
Yeung JP et al. Oral immunotherapy for milk allergy. *Cochrane Database of systematic reviews.* 2012

1-LJ XM et al. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2000

2-LJ XM et al. A murine model of IgE-mediated cow's milk hypersensitivity, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2000
Arslanoglu S et al, Early neutral prebiotic oligosaccharide supplementation reduces the incidence of some allergic manifestations in the first 5 years of life. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2012

Gourbeyre P et al, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol.* 2011

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het hoofddoel van dit project is het verbeteren van de effectiviteit en het verminderen van bijwerkingen van allergeen-specifieke immunotherapie aan de hand van immuunmodulerende voedingssupplementen. Tevens willen wij het werkingsmechanisme van de genoemde combinatie onderzoeken. Dit project bestaande uit pre-klinische dier- en *in vitro* experimenten zal fundamentele kennis opleveren die in de toekomst mogelijk kan bijdragen aan vervolgonderzoek en het testen van de genoemde strategie in een klinische studie. Binnen de projectduur van 5 jaar is deze doelstelling realistisch en haalbaar vanwege de uitgebreide expertise die binnen de projectgroep aanwezig is aangezien onderzoekers, artsen en bedrijven samenwerken (zie partners sectie 3.1). De verschillende partners die deelnemen aan dit project brengen allen specifieke kennis en ervaring mee die de uitvoering van de experimenten ten goede komt. Vanwege het voorbereidende onderzoek naar immuunmodulatie via voedingssupplementen wat voorafgaand aan dit project is uitgevoerd, wordt verwacht dat het hoofddoel haalbaar is. Voorbeelden van voedingssupplementen uit eerder onderzoek zijn meervoudig onverzadigde vetzuren,

prebiotica, probiotica en/of combinaties ervan (Rijnierse, 2011)(van den Elsen, 2013)(Gourbeyre, 2011)(Schouten, 2009).

Rijnierse A et al, Food-derived oligosaccharides exhibit pharmaceutical properties Eur J Pharmacol. 2011

Van den Elsen LW et al, Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. Clin Exp Allergy. 2013

Gourbeyre P et al, Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. J Leukoc Biol. 2011

Schouten B et al, Cow milk allergy symptoms are reduced in mice fed dietary synbiotics during oral sensitization with whey. J Nutr. 2009

3.3 Belang

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

Tot dusver bestaan er geen geschikte therapieën voor patiënten, zowel volwassenen als kinderen, met voedselallergieën. Het onderzoek dat zal worden uitgevoerd aan de hand van deze aanvraag, zal wetenschappelijke kennis opleveren betreffende de effectiviteit van allergeen-specifieke immunotherapie in combinatie met een dieetinterventie in diernodellen. Ook zal kennis verkregen worden over de mogelijkheid om eventuele bijwerkingen van immunotherapie te verminderen met behulp van de dieetinterventie. Daarnaast zal het onderzoek meer inzicht geven in het werkingsmechanisme van de therapie in combinatie met de immunomodulerende voedingscomponenten. Het in kaart brengen van de cellulaire en humorale veranderingen die worden geïnduceerd door de toegepaste behandelingen, zal bijdragen aan de optimalisering van de strategie in diernodellen. In de toekomst verwachten wij dat deze fundamentele kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van een therapie bij mensen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen dit project zal onderzocht worden of immunomodulerende voedingssupplementen, antigeen-specifieke immunotherapie kunnen optimaliseren in diernodellen. De onderzoeksstrategie is onder te verdelen in twee verschillende gedeeltes die gezamenlijk de hoofddoelstelling kunnen bereiken.

1. Het vaststellen van de effectiviteit/het verminderen van bijwerkingen van de therapeutische strategie:

Het eerste deel van de onderzoeksstrategie is gericht op het vaststellen van de effectiviteit van de allergeen-specifieke therapie in combinatie met een bepaalde dieetinterventie. Bepaald moet worden welke therapeutische aanpak een effect heeft op de acute allergische response en/of tolerantie inductie tegen het allergeen. Daarnaast zal onderzocht worden welke therapeutische aanpak eventuele bijwerkingen van de immunotherapie vermindert.

2. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de therapeutische strategie:

Wanneer is vastgesteld welke specifieke therapeutische aanpak effectief en met minder bijwerkingen kan worden toegepast in diernodellen, zullen wij het onderzoek verder toespitsen op het werkingsmechanisme. Inzicht in specifieke veranderingen die optreden op cel-, eiwit- en DNA niveau levert wetenschappelijke kennis op die in de toekomst een bijdrage zou kunnen leveren aan vervolgonderzoek en aan het testen van de strategie in een klinische studie. Om het werkingsmechanisme in de mens tevens uit te diepen zal parallel aan dit onderzoek in diernodellen, aanvullend humaan *in vitro* onderzoek worden uitgevoerd in een apart AIO project. De *in vitro* modellen zijn gebaseerd op combinaties van humane darmepitheelcellijnen en bloedcellen uit gezonde personen en allergische patiënten. Immuncellen verkregen van allergische patiënten zullen al dan niet in combinatie met darmepitheelcellen worden blootgesteld aan de voedingscomponenten, zodat er gekeken kan worden of deze supplementen effect hebben op de cellulaire response en wat het immunologische mechanisme is. De verkregen resultaten worden binnen het consortium besproken en kunnen bijdragen aan de verfijning en bijstellen van het onderzoek in diernodellen en in de toekomst ook aan de translatie van de strategie naar een klinische studie. De betrokkenheid van

onderzoekers/artsen van het academisch ziekenhuis (UMC) met ervaring in voedselallergie biedt het consortium de mogelijkheid om de experimentele bevindingen uit het *in vitro* en dieronderzoek in de toekomst naar studies in de mens te vertalen.

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

1. Het vaststellen van de effectiviteit/veiligheid van de therapeutische strategie:

Voor dit onderdeel wordt uitgegaan van het al bestaande **muismodel voor voedselallergie** (Schouten 2008)(Smit 2012). Dit type experiment bestaat uit 3 verschillende fasen. In de eerste fase worden de naïeve muizen gesensibiliseerd met het allergeen zodat de voedselallergie ontstaat. In de tweede fase vindt de immunotherapie plaats door het herhaaldelijk toedienen van een bepaalde dosering van het allergeen met of zonder een dieetinterventie. In de derde fase worden de muizen blootgesteld aan een hoge dosering van hetzelfde allergeen (challenge) om de effectiviteit van de therapie vast te stellen. Onderstaande thema's beschrijven welke aspecten binnen dit type experiment gevarieerd kunnen worden om zo een optimale therapeutische benadering te ontwikkelen:

- **Type allergeen:** Een voedselallergie kan door verschillende allergenen worden veroorzaakt en daardoor kan het verloop van de allergie afwijken.

Voorbeelden van allergenen zijn wei of caseïne eiwitten uit koemelk (Schouten 2008), pinda eiwitten (Smit, 2015) en kippenei eiwitten (Hogekamp, 2015). Daarnaast kunnen bepaalde allergenen bijvoorbeeld meer voorkomen bij kinderen vergeleken met volwassenen en vice versa. Om de immunotherapie zo breed mogelijk te kunnen toepassen zal in deze aanvraag gebruik worden gemaakt van verschillende relevante allergenen of allergeencombinaties.

- **Type allergeen structuur:** Om een allergische response in gang te zetten, dient het allergeen van interesse opgenomen en gepresenteerd te worden door antigeen-presenterende cellen aan T-cellen. De structuur van het eiwit speelt hierbij een essentiële rol aangezien de keten van aminozuren een exacte opbouw dient te hebben om te kunnen worden herkend. Wanneer een intact eiwit wordt opgenomen, zal de allergische response volgen. Het is daarom relevant om te onderzoeken of immunotherapie veiliger en/of effectiever kan worden gemaakt door de eiwitstructuur dusdanig aan te passen dat een allergische response wordt voorkomen terwijl het proces van tolerantie inductie doorgang vindt. Naast heel eiwit kan gebruik gemaakt worden van eiwitfragmenten of specifieke peptiden die worden herkend door T-cellen, maar geen allergische response kunnen veroorzaken (Meulenbroek 2013).

- **Type immunotherapie:** Uit eerder onderzoek is gebleken dat immunotherapie kan worden uitgevoerd via verschillende toedieningsroutes (Kostadinova 2013). De allergenen kunnen bijvoorbeeld oraal, subcutaan, sublinguaal of epidermaal worden toegediend om zo de target cellen van het immuun systeem te bereiken. Om de meest effectieve methode te vinden, zullen we binnen dit project meerdere toedieningsroutes gebruiken in de experimenten. Het bepalen van de meest optimale route zal afhangen van de effectiviteit ervan in combinatie met de immuun-modulerende voedingssupplementen.

- **Type voedingssupplement:** Uit eerder onderzoek is gebleken dat het immuunsysteem gemoduleerd kan worden door componenten in de voeding. Er zijn niet-verteerbare suikers (prebiotica) (Nauta 2013), vitamines (Ruhl, 2007), meervoudig onverzadigde vetzuren (van den Elsen, 2013) en ook bacteriën (probiotica)(Castellazzi, 2013) geïdentificeerd, die een bijdrage kunnen leveren aan de optimale werking van het immuunsysteem. Tijdens een voedselallergie is het proces van natuurlijke tolerantie verstoord en reageert het immuun systeem op de aanwezigheid van de allergenen in de voeding. Door de immuun-modulerende componenten toe te voegen aan het dieet wordt getracht het proces van tolerantie inductie tijdens de immunotherapie te ondersteunen. Om de meest optimale supplementen te selecteren zullen meerdere componenten en/of combinaties getest worden in de huidige aanvraag.

Schouten B et al, Acute allergic skin reactions and intestinal contractility changes in mice orally sensitized against casein or whey. IAAI . 2008

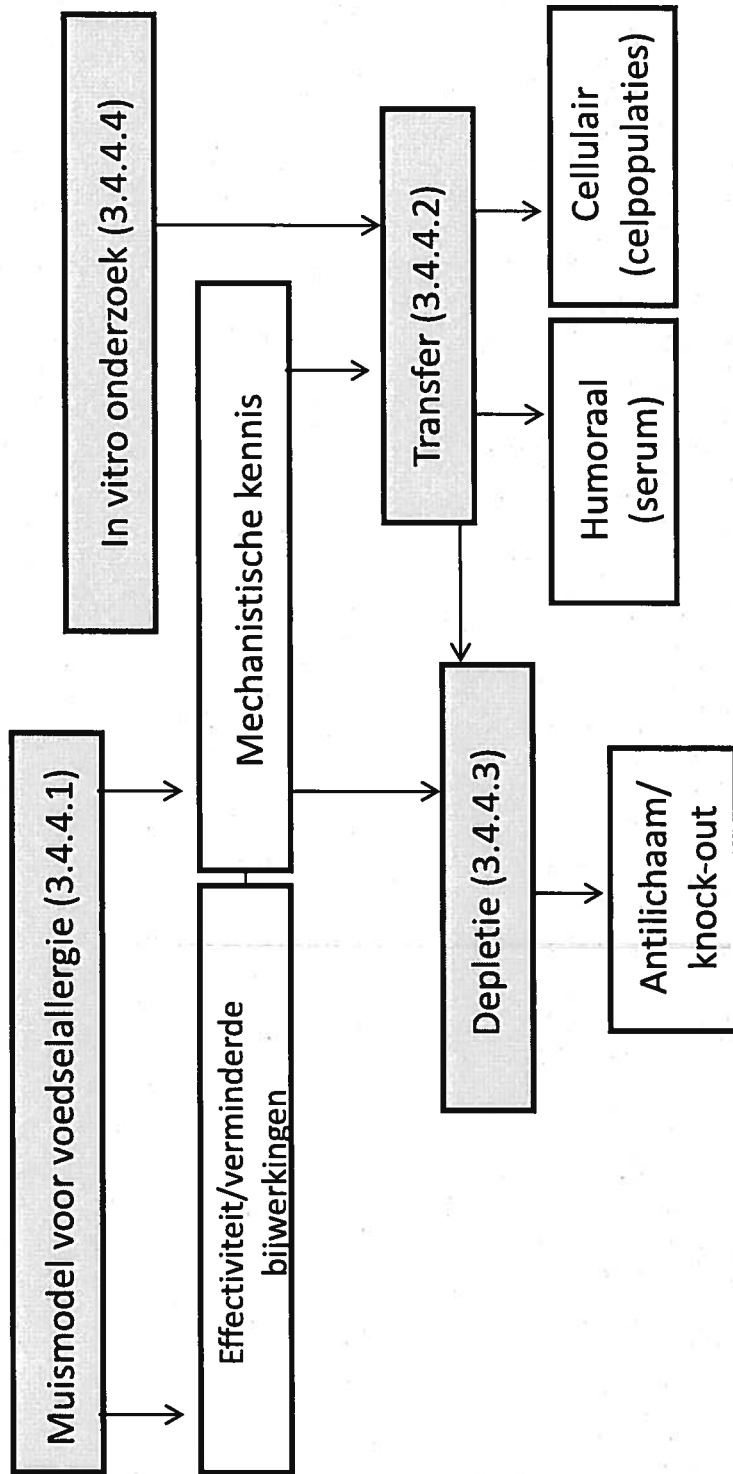
Smit JJ et al, Contribution of Classic and Alternative Effector Pathways in Peanut-Induced Anaphylactic Responses, Plos One, 2012.

Smit JJ et al, Heterogeneous responses and cross reactivity between the major peanut allergens Ara h 1, 2,3 and 6 in a mouse model for peanut allergy. Clin Transl Allergy. 2015

- Hogenkamp A et al., Supplementation of Mice with Specific Nondigestible Oligosaccharides during Pregnancy or Lactation Leads to Diminished Sensitization and Allergy in the Female Offspring. J Nutr. 2015
- Meulenbroek LA et al., Oral treatment with beta-lactoglobulin peptides prevents clinical symptoms in a mouse model for cow's milk allergy. PAl. 2013
- Kostadinova AI et al., Immunotherapy – risk/benefit in food allergy. PAl. 2013
- Nauta AJ and Garssen J. Evidence-based benefits of specific mixtures of non-digestible oligosaccharides on the immune system. Carbohydr Polym. 2013
- Ruhl R et al., Role of vitamin A elimination or supplementation diets during postnatal development on the allergic sensitization in mice. Mol Nutr Food Res. 2007
- Van den Eisen LW et al., Dietary long chain n-3 polyunsaturated fatty acids prevent allergic sensitization to cow's milk protein in mice. Clin Exp Allergy. 2013
- Castellazzi AM et al., Probiotics and food allergy. Ital J Pediatr. 2013

2. Het onderzoeken van het werkingsmechanisme van de therapeutische strategie:

- Om deel 2 van de onderzoeksstrategie uit te voeren wordt eveneens gebruik gemaakt van type dierexperiment **muismodel voor voedselallergie** zoals hierboven is beschreven. Tijdens de verschillende fasen van het experiment (sensitisatie, immunotherapie en challenge) kunnen immunologische parameters zoals mast cel degranulatie markers (mouse Mast Cell Protease-I en histamine), T cel populaties (T helper 1 cellen en regulatorische T cellen) en serum immunoglobulinen (IgE en IgG1) (Schouten 2008) (Jo, 2014) worden onderzocht in bloed, organen zoals de milt en lymfeknopen en/of andere lichaamsvloeistoffen. Daarnaast wordt er gebruik gemaakt van 3 variaties op het voedselallergie model: het type **transfer studie**, het type **depletie studie** en het type **donor studie**. Deze typen experiment kunnen een bijdrage leveren aan het onderzoek naar de mechanistische achtergrond van de effecten die we verwachten te vinden met het muismodel voor voedselallergie. Hieronder staan deze typen dierexperiment beschreven en daarnaast hebben wij een schematisch overzicht toegevoegd om aan te geven hoe de verschillende typen experimenten zich onderling verhouden:
- **Transfer studie:** Binnen een transfer experiment is het mogelijk om bepaalde celpopulaties zoals CD4+CD25+ regulatorische T cellen geïsoleerd uit de milt (van den Elsen, 2013) (Schouten, 2010) of mesenterische lymfeknopen (van Esch, 2011), of bijvoorbeeld supernatant van in vitro gestimuleerde milt cellen (Schouten, 2010) of antilichamen in serum (Murphy, 2014) (Kanjrawi, 2013), van een donor dier over te brengen naar een ontvanger dier. Deze strategie geeft de onderzoeker de mogelijkheid om te testen of een bepaalde bescherming tegen de allergie wordt veroorzaakt door deze specifieke factoren. Het donor dier ondergaat de behandeling en na de transfer wordt het ontvanger dier blootgesteld aan de (hoge) dosering van het allergeen. Wanneer de allergische respons is verlaagd, kan men vaststellen dat de overgebrachte factor hierbij een rol heeft gespeeld. De aard van de transfer wordt bepaald aan de hand van resultaten uit het muismodel voor voedselallergie en in vitro onderzoek met primair materiaal (zie schema).
 - **Depletie studie:** Binnen een depletie experiment is het mogelijk om bepaalde factoren te blokkeren of te verwijderen in een dier. Dit kan in de praktijk bereikt worden door mutaties in het DNA (knock-outs) van het dier te veroorzaken zoals de korte-keten vetzuur receptor GPR41-knockout muis (Trompette 2013), maar ook door bijvoorbeeld specifieke antilichamen en/of antagonistische in het dier te spuiten die een specifiek target kunnen blokkeren zoals de CD25 receptor op regulatorische T cellen (van Esch, 2010). De invloed die het blokkeren/verwijderen heeft op de allergische respons kan inzicht geven in de rol van de target in het tot stand komen van de allergische reactie of de bescherming daartegen. De aard van de depletie wordt bepaald aan de hand van resultaten uit het muismodel voor voedselallergie in combinatie met in vitro onderzoek met primair materiaal. Daarnaast zullen ook resultaten uit de transfer studie een basis vormen voor het depletie experiment (zie schema).
 - **Donor studie:** Om mechanistische kennis te verkrijgen kunnen in vitro experimenten een goede aanvulling zijn. De werkzaamheid van voedingssupplementen kan bijvoorbeeld in vitro getest worden op primaire cellen zoals T cellen en dendritische cellen die worden gekweekt uit beenmerg cellen (Lutz, 1999) of uit de lymf organen (Smit, 2015) van donordieren die al dan niet allergisch zijn. Het in vitro onderzoek dient ter ondersteuning van de dierexperimenten en zal bijdragen aan kennis van het mechanisme van tolerantie inductie (zie schema).



Schouten B et al., Acute allergic skin reactions and intestinal contractility changes in mice orally sensitized against casein or whey. *IAAI* . 2008

Jo J et al., Role of cellular immunity in cow's milk allergy: pathogenesis, tolerance induction, and beyond. *Mediators of Inflamm*. 2014

Van den Elsen LWJ et al., CD25+ regulatory T cells transfer n-3 long chain polyunsaturated fatty acids-induced tolerance in mice allergic to cow's milk protein. *Allergy*. 2013

Schouten B et al., Oligosaccharide-induced whey-specific CD25(+) regulatory T-cells are involved in the suppression of cow milk allergy in mice. *J Nutr*. 2010

Van Esch BCAM et al., Oral tolerance induction by partially hydrolyzed whey protein in mice is associated with enhanced numbers of Foxp3+ regulatory T-cells in the mesenteric lymph nodes. *PAI*. 2011

Schouten B et al., Contribution of IgE and immunoglobulin free light chain in the allergic reaction to cow's milk proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 2010

Murphy JT et al., Anaphylaxis caused by repetitive doses of a G1TR agonist monoclonal antibody in mice. *Blood*. 2014

Kanjarawi R et al., Regulatory CD4+Foxp3+ T cells control the severity of anaphylaxis. *PLoSOne*. 2013

Trompette A et al., Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nature medicine*. 2013

Van Esch BCAM et al., Depletion of CD4+CD25+ T cells switches the whey-allergic response from immunoglobulin E- to immunoglobulin free light chain-dependent. *Clin Exp*

Allergy. 2010

Lutz MB et al, An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods. 1999
Smit JJ et al, Heterogeneous responses and cross reactivity between the major peanut allergens Ara h 1, 2,3 and 6 in a mouse model for peanut allergy. Clin Transl Allergy. 2015

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 beschreven onderdelen van de onderzoeksstrategie zijn essentieel voor de ontwikkeling van een effectieve therapeutische benadering met minder bijwerkingen voor voedselallergieën in diersystemen. Het eerste deel van de onderzoeksstrategie legt de nadruk op het aantonen van de effectiviteit van een specifieke behandeling en dient om vast te stellen welke aanpak significant effect heeft op de acute allergische respons en/of tolerantie-inductie en minder bijwerkingen heeft. Door verschillende combinaties te testen binnen het muismodel voor voedselallergie verwachten wij vast te kunnen stellen welke voedings-supplementen het best bijdragen aan het onderdrukken van de allergie en het induceren van tolerantie. Het aantonen van significante vermindering van de allergische respons na challenge zien wij als een mijlpaal waarna wij zullen besluiten om onderzoek te verrichten naar het werkingsmechanisme van de geteste combinatie van immunotherapie en voedingssupplementen. Onderdeel 2 van de onderzoeksstrategie volgt op onderdeel 1, zodat de werking van de therapeutische benadering meer in detail onderzocht kan worden (zie ook schematische weergave van de typen dierexperiment). Inzicht in specifieke veranderingen die optreden op cel-, eiwit- en DNA-niveau levert wetenschappelijke kennis op die in de toekomst een bijdrage zou kunnen leveren aan vervolgonderzoek en aan het testen van de strategie in een klinische studie.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Muismodel voor voedselallergie
2	Transfer studie
3	Depletie studie
4	Donor studie
5	
6	
7	
8	
9	
10	

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
	NTS 20151220								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	DEC Advies				x		x	x	
4	Bijlage dierproef 1				x			x	
5	Bijlage dierproef 2				x			x	
6	Bijlage dierproef 3				x			x	
7	Projectvoorstel				x			x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

18 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 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? <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 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	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									
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. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein-Noord 9</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Postbus</td> <td>9102</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Postcode en plaats</td> <td>6525EZ Nijmegen</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein-Noord 9	Postbus	9102	Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Groteplein-Noord 9																
Postbus	9102																
Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">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="0"> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td style="text-align: right;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Functie</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Afdeling</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">Telefoonnummer</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="border-right: 1px solid black;">E-mailadres</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(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 Dhr. Mw. [Redacted]
- Functie Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling [Redacted]
- Telefoonnummer [Redacted]
- E-mailadres instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 1 0 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 0 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Targeting the prostaglandinE receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het remmen van reuma via de EP4-receptor
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted]
- E-mailadres [Redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Leges
 Wijziging € Leges
- 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; Informatie voor de CCD factuur

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[Redacted]
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen [Redacted]
Datum	14 - 08 - 2015
Handtekening	[Redacted]



DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer 2015-0066
2. Titel van het project: Targeting the prostaglandin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis.
3. Titel van de NTS: Het remmen van reuma via de EP4-receptor.
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: 04-05-2015
 - vragen gesteld: 11-05-2015
 - termijnonderbreking(en) van 11-05-2015 tot 13-05-2015 en van 19-05-2015 tot 20-05-2015
 - aanpassing aanvraag: 13-05-2015
 - aanvraag compleet: 13-05-2015
 - anderszins behandeld:
 -
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - advies aan CCD: 14-08-2015
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)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 11-05-2015
 - Strekking van de vragen:
 -
 - **Project Proposal:**
 - 3.1 De commissie mist informatie over de gebruikte EP4-receptor antagonist, en verzoekt de onderzoekers deze informatie toe te voegen.

- 3.4.2 De onderzoekers willen de effecten van de EP4-receptor antagonist eerst in het AIA-model onderzoeken, en daarna in het 'golden standard' CIA-model. Kennelijk is een effect in dit laatste model noodzakelijk alvorens een translatie naar de kliniek kan worden begonnen. De commissie vraagt zich af of de onderzoekers niet kunnen beginnen met het CIA-model. Is er bij een ontbrekend effect in het CIA model nog een rationale voor het werk in het AIA model? Indien zij het effect van de EP4-receptor antagonist in ieder geval in het AIA-model willen testen, dienen zij dit te onderbouwen.
- De toegevoegde waarde van het SCID mouse model blijkt niet duidelijk uit de gegeven beschrijving. De onderzoekers worden verzocht dit toe te lichten.
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-3, onderdeel A, eerste vraag. De onderzoekers schrijven dat de dieren behandeld worden met de EP4 receptor. Bedoelen zij de EP4 receptor antagonist?
- - Dierproef 1, onderdeel A, tweede vraag. De onderzoekers verduidelijken dat de behandeling systemisch zal zijn omdat het AIA model een systemisch arthritis model is. Bij de eerste vraag hebben zij uitgelegd dat het AIA-model een lokaal model is. Zij worden verzocht dit zodanig te formuleren dat het in overeenstemming met elkaar is.
- - Dierproef 3, onderdeel A, tweede vraag. De onderzoekers verduidelijken dat de behandeling systemisch zal zijn omdat het AIA-model een systemisch arthritis model is. In deze dierproef wordt een ander model gebruikt. Zij worden verzocht het juiste argument te gebruiken.
- Datum antwoord: 13-05-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Project Proposal:**
- 3.1. " [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]. " This text has been added to our application.
- 3.4.2. "After demonstrating proof-of-concept in this AIA model, we will continue with validating the therapeutic efficacy of our EP4 receptor antagonist in a second arthritis model. RA is a very heterogeneous disease, and the many different arthritis models all only partially mimic the disease of certain patients or specific stages of the arthritis process. Therefore, further confirmation of therapeutic efficacy of EP4 receptor targeting in a second, more severe model is highly informative, and will teach us more about responses in more progressive and destructive RA processes. Our choice for validation is the more challenging, systemic collagen-induced arthritis model. Because this model is more severe, shows more variation and does not contain the control tissues (left knee joint in AIA) that we prefer for showing our proof of concept, we decided to start in the AIA and next validate in the CIA model."
- "The SCID model, as final model, is clearly the translational step of our research. We are currently testing the EP4 receptor antagonist ex vivo on human synovium explants, but culture time of these complex tissues is limited to 24 hours. Therefore, to expand on our potentially positive findings in experiment 1 and 2, we want to provide further proof that

human synovial tissue in an in vivo setting also response well to systemic treatment with an EP4 receptor antagonist. This translational part of our study will greatly support further decisions to continue or not with clinical studies in RA patients.”

- These two text boxes have been added to our proposal.
-
- **Description of Animal Procedures:**
- Dierproef 1-3, A1. This should indeed be the EP4 receptor antagonist and has been changed accordingly.
- Dierproef 1, A2. Thank you for pointing out this inconsistency, this was only partially wrong since the AIA is systemically induced (by immunization and boosting) and is expressed locally in the knee joint after injection of the antigen. The text has been changed as follows: “Treatment will be applied systemically, not locally, since the AIA model is a **systemically-induced (but locally expressed)** arthritis model...”.
- Dierproef 3, A2. My apologies for this incorrect field, the text has been replaced by: “Treatment will be applied systemically in line with experiment 1 and 2, also because of the fact that the grafts are transplanted subcutaneously, and therapeutic application in the clinic is also foreseen as being systemically provided.”
- Datum: 19-05-2015
- Strekking van de vragen: Bij de beantwoording van de vragen en opmerkingen over het project proposal punt 3.4.2 mist nog een directe beantwoording van de volgende vragen:
- De commissie vraagt zich af of de onderzoekers niet kunnen beginnen met het CIA-model. Is er bij een ontbrekend effect in het CIA model nog een rationale voor het werk in het AIA model?
- Datum antwoord: 20-05-2015
- Strekking van het antwoord: In our approach, we choose to start with the AIA because this model is [redacted] cells and has the practical characteristics to demonstrate the mode of action. In the next step, we continue with the CIA that besides a [redacted] part is also strongly driven by B cells and antibodies. If our inhibitor fails to show efficacy in this second model, we still have obtained the knowledge that strongly [redacted] disease like the AIA can be blocked by targeting the EP4 receptor, and this may be followed [redacted] [redacted] in disease models for systemic sclerosis, multiple sclerosis or psoriasis. Because this is expected to be future plans beyond the next 5 years, these future plans are not included in this application.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

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

en het imagen in als licht, het ongerief als gevolg van de operatie schat de commissie in als matig, evenals het ongerief veroorzaakt door de gewrichtsontstekingen. Het cumulatief ongerief voor alle muizen in de beschreven vergunningaanvraag, matig, is dus juist ingeschat.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven in de genoemde arthritis muismodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
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. De DEC is het eens met het achtereenvolgens inzetten van de beschreven muismodellen voor arthritis en met onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door de logische, stapsgewijze aanpak: ████████ gestuurd model (AIA) > systemisch model (CIA) > gehumaniseerd muismodel (translationeel), wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 550 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 dieren krijgen extra verzorging na anesthesie. Dagelijks controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. 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 wordt inzicht verkregen met betrekking tot de vraag of het blokkeren van de EP4 receptor met een antagonist mogelijk een goede behandeling zou kunnen zijn voor mensen met reumatisch arthritis. De resultaten geven onder andere een antwoord op de vraag of het zinvol zou zijn om de gebruikte antagonist verder te onderzoeken in klinische trials bij mensen. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere therapieën voor mensen met reumatische arthritis. Het belang van het beschikbaar komen van meer therapeutische opties en betere therapieën acht de DEC substantieel, gezien de omvang van dit medische probleem en gezien het feit dat de huidige therapieën bij veel mensen niet of niet goed blijken te werken.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het induceren van RA symptomen en de daarop volgende behandeling. 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 gebruik van de dieren en het daarbij optredende 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.



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Antigen-induced arthritis</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Antigen-induced arthritis
Serial number	Type of animal procedure					
1	Antigen-induced arthritis					

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.

To study the effect and mode-of-action of blocking the EP4 receptor during experimental arthritis, we will start our in vivo studies with blocking the EP4 receptor in the antigen-induced arthritis (AIA) model. This is a local, [REDACTED] driven arthritis model induced by immunization (day 0) and boosting (day 7) with methylated Bovine Serum Albumin (mBSA) in FCA as antigen, and arthritis will be limited to the right knee joint which is subsequently injected with a small amount of this antigen (day 21). The left control joint will serve as internal control and will be injected with saline only (day 21; all AIA procedures under anesthesia).

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 2 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

This mono-arthritis is ideal for our proof-of-concept study, because it allows us, besides demonstrating the clinical efficacy of the EP4 receptor antagonist on arthritis pathology (imaging, pain/gait analysis, histology), to also demonstrate the mechanism(s) through which this inhibitor acts.

From both the inflamed (right) and the non-inflamed (left) joint, synovial tissue, washout and draining lymph nodes will be obtained for analysis of [REDACTED] cytokine expression (Luminex) and gene expression profiles (RT-QPCR), which will allow us to demonstrate the effect of EP4 receptor inhibition on [REDACTED] differentiation and activation in vivo.

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

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 2 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

After intra-articular injection of the antigen (mBSA), arthritis will start in the injected knee joint, but this joint inflammation will disappear in 3-4 weeks when all antigen is cleared from the joint. Therefore, the therapeutic window in this model is limited to a treatment period of maximum 2 weeks.

Treatment will be applied systemically, not locally, since the AIA model is a **systemically-induced (but locally expressed)** arthritis model [REDACTED]

During the treatment period, a maximum of 4 times anesthesia is foreseen for in vivo imaging of inflammation (<30 min) and collection of blood (< 2 min) to determine [REDACTED] and cytokine levels.

At the end of the study, mice will be terminally bled under anesthesia and tissues will be collected for further analysis.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-) en het gewenste significantieniveau (a). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Species: C57Bl6N mice, since this is the most commonly used strain for the AIA model. The use of female mice is preferred to prevent problems due to fighting of animals. (The choice for use of mice in general in this study was already previously motivated.)

Age range: young adult, standard approx. 10-12 week old mice are used in this type of arthritis research.

Origin: certified animal supplier like Janvier, Jackson or Charles River.

Estimated number of animals: maximum 200 mice, based on a max. of 5 experimental groups (max. 3 doses of EP4 receptor antagonist, a negative and a positive control treatment), and per group a rough estimate of max. 10 mice per group for each of the 4 different readout parameters at time of sacrifice (histology, FACS, Luminex, RT-QPCR). Poweranalysis will further sophisticate the required number of animals per technique in the final study design.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl6N mice	Certified supplier	200	10-12 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 are at a stage of our project in which we need to proof our complex hypothesis regarding the EP4 receptor in joint pathology and the immune system in the complexity of an organism with similarities to the human system, and that cannot be further achieved with alternatives in vitro and without the use of animals.

Reduction: With the proposed strategy and step-wise approach, we will prevent unnecessary use of animal in case the findings in the first studies do not support our hypothesis. Sample size calculations will determine the group sizes, and the experimental groups included are required to address the question. A further reduction will result in unreliable data and is therefore not possible.

Refinement: The AIA model has been chosen for its best chances to demonstrate clinical efficacy and proof-of-concept within one model, with arthritis limited to one knee joint. Since pain is a readout parameter in the study (by gait analysis and incapitance tester), and pain killers can affect the immune response and thus the disease model, they are not used in the study. Two injections with FCA are required to induce a good immune response in our AIA protocol, but no adverse events like ulceration of the skin due to these injections have been observed in our lab. All AIA-procedures will be performed under adequate anesthesia, and extra comfort will be provided by providing soft tissues during recovery of anesthesia. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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

Although arthritis and pain cannot be minimized in these studies, extra comfort will be provided by providing soft paper tissues towels during recovery of anesthesia during the induction of arthritis. Food pellets may be provided at the bottom during arthritis development, so mice do not have to stand on their two hind paws to reach the food. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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?

All mice in the AIA studies will have potential pain from the joint inflammation in the right knee joint. However, as mentioned under the 3Rs, pain killing in these studies is not compatible with our readout parameters and objective to study inflammation processes.

In < 2% of the animals the arthritis will lead to a reduced mobility.

Explain why these effects may emerge.

Severe joint inflammation and destruction of cartilage and bone might cause such a reduced mobility.

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

This reduced mobility (and the underlying joint inflammation) cannot be prevented since it is related to the research question, experimental model and study design. However, these animals showing reduced mobility will be taken out of experiment having reached the humane end point criteria.

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.

A mouse will be taken out of experiment when it shows reduced mobility due to severe joint inflammation/destruction, as demonstrated by less loading of the affected paw, difficult movement and longer periods of resting while cage mates are active.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience with the model, the incidence of decreased mobility is estimated to be < 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

100% moderate

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.

Animals are sacrificed to collect tissues for further analysis.

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.
- 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>Collagen-induced arthritis</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Collagen-induced arthritis
Serial number	Type of animal procedure					
2	Collagen-induced arthritis					

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.

After demonstrating proof-of-concept in the AIA model, we will continue with validating the therapeutic efficacy of our EP4 receptor antagonist in the more challenging, systemic collagen-induced arthritis (CIA) model, a model that is internationally regarded as the "golden standard" for therapeutic testing of anti-rheumatic drugs. This model is induced by immunization with bovine collagen type II in FCA, and arthritis starts after a second injection of this antigen in saline. This model is [REDACTED], but is more challenging due to the systemic character of this model, in which all synovial joints could get affected.

CIA is induced by immunisation with bovine collagen type II (CII) in FCA on day 0 under anesthesia, and boosting with CII in PBS by i.p. injection on day 21. Arthritis will start to develop around day 21-28, and therefore mice will be scored macroscopically for signs of arthritis 3x/week from the day of booster till the end of the study.

Primary outcome parameter will be clinical efficacy of the EP4 receptor antagonist on arthritis pathology (macroscopic scores, imaging, pain/gait analysis, histology). In addition, we will study the effect of EP4 **receptor** inhibition on [REDACTED] cytokine expression (Luminex) and gene expression profiles (RT-QPCR) in draining lymph nodes, synovial tissue and blood.

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

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 3 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

After intra-peritoneal injection of the antigen (CII), arthritis will start to progress in both the front and the hind paws, with a progressive character which means that without intervention, mice will start reaching the humane end points of severe arthritis around week 8-10 of the study. Therefore, we limit our therapeutic window from week 3 to maximum week 7. Mice will be included in the treatment groups after clear onset of the disease (based upon a standardized macroscopic scoring system for redness and swelling of toes and ankle joints) and subsequently treated for a period of maximum 3 weeks.

Treatment will be applied systemically, not locally, since the CIA model is a systemic arthritis model and [REDACTED]

[REDACTED]
During the treatment period, a maximum of 4 times anesthesia is foreseen for in vivo imaging of inflammation (<30 min) and collection of blood (< 2 min) to determine [REDACTED] and cytokine levels.

At the end of the study, mice will be terminally bled under anesthesia and tissues will be collected for further analysis.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n=1+2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-) en het gewenste significantieniveau (a). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Species: DBA-1 mice, since this is the only strain sensitive for our CIA model with bovine collagen type II. (The choice for use of mice in general in this study was already previously motivated.)

Age range: young adult, standard approx. 10-12 week old mice are used in this type of arthritis research.

Origin: certified animal supplier like Janvier, Jackson or Charles River.

Estimated number of animals: maximum 200 mice, based on a max. of 5 experimental groups (max. 3 doses of EP4 receptor antagonist, a negative and a positive control treatment), and per group a rough estimate of max. 10 mice per group for each of the 4 different readout parameters at time of sacrifice (histology, FACS, Luminex, RT-QPCR). Poweranalysis will further sophisticate the required number of animals per technique in the final study design.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
DBA-1 mice	Certified supplier	200	10-12 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 are at a stage of our project in which we need to proof our complex hypothesis regarding the EP4 receptor in joint pathology and the immune system in the complexity of an organism with similarities to the human system, and that cannot be further achieved with alternatives in vitro and without the use of animals.

Reduction: With the proposed strategy and step-wise approach, we will prevent unnecessary use of animal in case the findings in the first studies do not support our hypothesis. Sample size calculations will determine the group sizes, and the experimental groups included are required to address the question. A further reduction will result in unreliable data and is therefore not possible.

Refinement: The CIA model has been chosen as second step, since it is regarded as a more severe, but the golden standard model for therapeutic testing in preclinical arthritis. Since pain is a readout parameter in the study (by gait analysis), and pain killers can affect the immune response and thus the disease model, they are not used in the study. CIA immunisation with FCA will be performed under adequate anesthesia, and the tail is thoroughly cleaned after injection to prevent skin irritation around the injection site. Extra comfort will be provided by providing soft tissues during recovery of anesthesia. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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

Although arthritis and pain cannot be minimized in these studies, extra comfort will be provided by providing soft paper tissues towels during recovery of anesthesia. Food pellets will be provided at the bottom during arthritis development, so mice do not have to stand on their two hind paws to reach the food. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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?

All mice in the CIA studies will have potential pain from the joint inflammation in front and hind paws. However, as mentioned under the 3Rs, pain killing in these studies is not compatible with our readout parameters and objective to study inflammation processes. In < 5% of the animals the arthritis will lead to a reduced mobility.

Explain why these effects may emerge.

Severe joint inflammation and destruction of cartilage and bone will cause such a reduced mobility.

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

This reduced mobility (and the underlying joint inflammation) cannot be prevented since it is related to the research question, experimental model and study design. However, these animals showing reduced mobility will be taken out of experiment having reached the humane end point criteria.

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.

A mouse will be taken out of experiment when it shows reduced mobility due to severe joint inflammation/destruction, as demonstrated by less loading of the affected paw, difficult movement and longer periods of resting while cage mates are active.

An additional quantitative criterium that will be applied, is when a mouse reaches a macroscopic arthritis score of 7 on a scale of 0-8 based on swelling and redness of the four paws (toes and ankles/wrists); the mouse will then be taken out of experiment.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience with the model, the incidence of decreased mobility is estimated to be < 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).

100% moderate

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.

Animals are sacrificed to collect tissues for further analysis.

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.
- 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>RA synovium SCID mouse</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	3	RA synovium SCID mouse
Serial number	Type of animal procedure					
3	RA synovium SCID mouse					

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.

Finally, to predict the efficacy of our inhibitor in RA patients, we would like to use our humanized arthritis model, the human RA synovium SCID mouse model, before seeking partners to setup highly expensive and time-consuming clinical trials. In this translational model, inflamed synovial tissue from RA patients undergoing joint replacement surgery is engrafted into SCID mice. After a standard engraftment period to reach good vascularization of the transplant, the mice are treated with the EP4 receptor antagonist, or positive or negative control treatments, and the effects of the treatment are studied on biomarker expression in the serum (e.g. human IL-6, IL-8) and histological analysis of the synovial graft (e.g. scoring of cellularity, immunohistochemistry). Starting these SCID studies will depend on the positive observed effects of EP4 targeting in the CIA model.

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

Mice will be treated with the EP4 receptor **antagonist** and relevant negative and positive controls for a maximum of 2 weeks with a maximum frequency of injection of twice daily per oral gavage or once daily intra-peritoneal/ subcutaneous.

For the transplantation of human RA synovium biopsied into the mice, SCID mice are anesthetized using isoflurane inhalation, and after disinfection of the neck region two small incisions (< 1cm) are made behind the ears (above the shoulders). Two small subcutaneous pockets are created to insert the transplants (6 mm of diameter), and subsequently each pocket is closed with a suture clip.

After transplantation of the two RA biopsies subcutaneously on the back of the SCID mice, an engraftment period of one week is required to reach good vascularization of the graft. At day 7, treatment with the inhibitor and controls will be started. Since previous studies demonstrated that inflammation-related biomarkers (like human IL-7 in the serum of these engrafted mice) drop rapidly after 10 days, the mice will be treated for one week and sacrificed at day 14 after transplantation.

Treatment will be applied systemically in line with experiment 1 and 2, also because of the fact that the grafts are transplanted subcutaneously, and therapeutic application in the clinic is also foreseen as being systemically provided.

During the treatment period, a maximum of 2 times anesthesia is foreseen for in vivo imaging of inflammation (<30 min) and collection of blood (< 2 min) to determine ██████ and cytokine levels.

At the end of the study, mice will be terminally bled under anesthesia and tissues will be collected for further analysis.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-) en het gewenste significantieniveau (a). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Species: SCID.CB17 mice, since this is a commonly used strain for this type of transplantation studies (due to their lack of functional T and B cells). The use of female mice is preferred to prevent problems due to fighting of animals. (The choice for use of mice in general in this study was already previously motivated.)

Age range: young, standard approx. 5-15 week old mice are used in this type of arthritis research. Mice should not get too old (generally over 26 weeks) due to the risk of leakiness, meaning that they might be able to develop functional T and/or B cells with ageing.

Origin: certified animal supplier like Janvier, Jackson or Charles River.

Estimated number of animals: maximum 150 mice, based on a max. of 5 experimental groups (max. 3 doses of EP4 receptor antagonist, a negative and a positive control treatment), and per group a rough estimate of max. 30 mice per group for histological analysis (because of interpatient variation an estimate of 10 donors is required with each 3 mice/group transplanted to detect differences between groups). Poweranalysis will further sophisticate the required number of animals per technique in the final study design.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mice, SCID.CB17	Certified supplier	150	5-15 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 are at a stage of our project in which we need to proof our complex hypothesis regarding the EP4 receptor in joint pathology and the immune system in the complexity of an organism with similarities to the human system, and that cannot be further achieved with alternatives in vitro and without the use of animals.

Reduction: With the proposed strategy and step-wise approach, we will prevent unnecessary use of animal in case the findings in the first studies do not support our hypothesis. Sample size calculations will determine the group sizes, and the experimental groups included are required to address the question. A further reduction will result in unreliable data and is therefore not possible.

Refinement: The SCID model has been chosen for its unique potential to demonstrate the effect of a potential new therapeutic agent on human arthritis tissue in an in vivo setting (without going into patients and clinical trials). The small surgical procedure in this model will be performed under adequate anesthesia, and no further pain killing is necessary because the grafts do not cause any further discomfort. Extra comfort will be provided by providing soft tissues during recovery of anesthesia. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or to be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

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

Extra comfort will be provided by providing soft paper tissue towels during recovery of anesthesia. No further adverse events are expected to occur. Daily inspections of the animal will allow animals with unexpected discomfort to get proper treatment or be taken out of experiment to prevent further discomfort and/or pain.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

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 mice will have discomfort from waking up after anesthesia and by the treatment injection, but no further adverse events are expected to occur.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

Not applicable

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

100% moderate

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.

Animals are sacrificed to collect tissues for further analysis.

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



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).
- 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. | Targeting the prostaglandin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" 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.

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disorder that is estimated to affect up to 1% of the population worldwide (Williams, 2006). Although not life-threatening, RA is a painful and debilitating disease that progressively limits the ability of patients to carry on normal lives. The factors that trigger this disease are not well understood but are believed to include both genetic and environmental components. Over the last decade, novel discoveries into the regulation of the immune system have permitted a better understanding of the development of autoimmunity.

Prostaglandin E2 (PGE2) is an arachidonic acid metabolite that acts as a potent biological mediator, exerting its effects via activation of membrane G protein-coupled receptors (GPCRs). There are four receptor subtypes (EP1, 2, 3 and 4; nomenclature follows Alexander et al., 2009) which selectively bind PGE2 and mediate its effects: Activation of EP1 receptors leads to the influx of calcium. Activation of EP3 receptors can induce a variety of signalling events depending on the particular EP3 splicing variant being expressed, with inhibition of adenylate cyclase activity via Gi being the most common effect. EP2 and EP4 receptors induce Gs-mediated activation of adenylate cyclase and a subsequent increase in intracellular cyclic AMP (cAMP). In addition, EP4 receptors activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signalling pathway (Fujino et al., 2003). PGE2 is known to play important roles in mediating many inflammatory responses and is often found at increased concentrations under a variety of inflammatory conditions (Hata and Breyer, 2004). Many reports suggest that PGE2, via the induction of intracellular cAMP, can suppress pro-inflammatory function, including receptor signalling and consequent production of interleukin (IL)-2 (Mustelin and Tasken, 2003; Chemnitz et al., 2006). PGE2 has also been implicated in differentiation and is reported to inhibit Th1 but not Th2 cytokines via the induction of intracellular cAMP (Betz and Fox, 1991; Gold et al., 1994; Hilkens et al., 1995; Okano et al., 2006). However, other reports indicate a pro-inflammatory role for PGE2. PGE2 can induce production of IL-23 from dendritic cells (DCs), which promotes the differentiation of pro-inflammatory

█ cells (Sheibanie et al., 2004; Khayrullina et al., 2008). Recent reports also suggest that PGE2 can synergize with IL-23 to promote expansion of human █ cells and enhance IL-17 production (Chizzolini et al., 2008; Boniface et al., 2009; Napolitani et al., 2009). Furthermore, PGE2 has been shown to exacerbate symptoms in mouse models of arthritis (Sheibanie et al., 2007a) and inflammatory bowel disease (Sheibanie et al., 2007b), and the blockade of EP2 and EP4 receptor signaling in a mouse model of arthritis can alleviate the severity of the disease (McCoy et al., 2002; Honda et al., 2006). Interestingly, EP4 was demonstrated to be a potential therapeutic target in a mouse model of multiple sclerosis (experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)), which revealed that deletion of the EP4 receptor in bone marrow-derived cells lead to a significant delay in the onset of EAE. This effect was due to an impaired preclinical inflammatory process indicated by reduced numbers of █ and of the █ secreted interleukin-17 (IL-17) in the blood of mice lacking EP4 in peripheral immune cells (Schiffmann et al., 2014). We demonstrated that the expression of PGE2 and the EP4 receptor are clearly enhanced in rheumatoid arthritis patients and in our experimental arthritis models, a █ suggesting that the PGE2/EP4 pathway might contribute █ arthritis processes. It is clear that the role of PGE2 and its EP receptors in inflammation processes like arthritis is still not fully identified, █

█. We therefore would like to test the potential of the EP4 receptor as therapeutic target █ experimental arthritis by blocking this receptor with a specific antagonist during experimental arthritis using a step-wise approach: (1) proof-of-concept in the mono-arthritic AIA model, (2) validation in the systemic CIA model, and (3) translational targeting in the humanized RA synovium SCID mouse model.

█ like RA. Therefore, CR6086 has been made available to us to further explore this therapeutic potential.

(Arthritis models and related abbreviation will be explained in further parts of the project.)

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why █ is 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 aim of the project is to determine whether blocking the EP4 receptor in murine experimental arthritis reduces the arthritis pathology reflected by joint inflammation and destruction of cartilage and bone, █ (experiment 1+2). In addition, we aim to translate positive findings of the mouse studies (experiment 1+2) to a humanized mouse model in which human RA synovial tissue is transplanted into SCID mice, to investigate whether also EP4 receptor blocking in this humanized setting results in disease suppression (experiment 3). This would support our hypothesis that also in clinical practice, EP4 receptor targeting might form a potential therapeutic approach in the treatment of rheumatoid arthritis.

We expect that the studies to reach our goals are feasible within this 5-year project: the proposed animal models are standardized and routinely used in our department of rheumatology, and for the transplantation model we have access to human surgery material from four hospitals in the Netherlands (on average 1-2 donors/month). In addition, the techniques for assessing the effects of intervention are optimized and frequently applied.

3.3 Relevance

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

Rheumatoid arthritis is an invalidating disease that affects 1-2% of the world population. Treatment of RA generally comprises a combination of NSAIDs (non-steroidal antiinflammatory drugs), DMARDs (disease-modifying anti-rheumatic drugs) and biologicals. Although a lot of new biological treatments have entered the market recently, there is still a group of 30% of the RA patients that do not respond to the current therapies. Therefore, the search for new RA treatments continues. More efforts are needed to develop effective and potent new therapies that can benefit the non-responding patient and reduce the costs for patient care which are increasing rapidly. The identification of such treatments will be of direct benefit for the patient. However, successful testing of new therapies in mouse models of arthritis is a crucial step before a new biological can be tested in the clinic.

Our EP4 receptor antagonist is [REDACTED], and therefore (if proven effective) a great alternative for the expensive biological treatments that continuously enter the market.

Proof of therapeutic efficacy in animal models of experimental arthritis is one of the steps of the pre-clinical process before testing a newly developed therapeutic in clinical trials in humans with the help of pharmaceutical partners or other sponsors. We want to demonstrate that blocking the EP4 receptor can indeed lead to enhanced reduction of joint inflammation and destruction in a murine model of experimental arthritis, and reduce synovial activation in a humanized, translation model of RA. These preclinical studies may contribute to the development of new therapeutic options for patients who do not respond to current available treatments.

3.4 Research Strategy

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

We would like to investigate the potential of the EP4 receptor as therapeutic target in [REDACTED] driven experimental arthritis by blocking this receptor with a specific antagonist during experimental arthritis using a step-wise approach: (1) proof-of-concept in the mono-arthritic AIA model, (2) validation in the systemic CIA model, and (3) translational targeting in the humanized RA synovium SCID mouse model.

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.

First, we will start with blocking the EP4 receptor in the antigen-induced arthritis (AIA) model (type of experiment 1). This is a local, [REDACTED] arthritis model induced by immunization and boosting with methylated Bovine Serum Albumin (mBSA) in FCA as antigen, and arthritis will be limited to the right knee joint which is subsequently injected with a small amount of this antigen. The left control joint will serve as internal control and will be injected with saline only. This mono-arthritis is ideal for our proof-of-concept study, because it allows us, besides demonstrating the clinical

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	Antigen-induced arthritis
2	Collagen-induced arthritis
3	RA synovium SCID mouse



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
p/a [REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN
[POSTNET]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015220
Bijlagen
2

Datum 18-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 augustus 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015220. 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. 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 verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

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: 1 oktober 2015
Geplande einddatum: 1 oktober 2020
Titel project: Targeting the prostaglandin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis
Titel niet-technische samenvatting: Het remmen van reuma via de EP4-receptor
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
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:



Functie:

Instantie voor dierenwelzijn

Plaats:

Nijmegen

Datum:

14 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
p/a [REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN
[POSTNET]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015220
Bijlagen
2

Datum 18-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 augustus 2015
Vervaldatum: 17 september 2015
Factuurnummer: 201570220

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015220	€ 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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
t.a.v. [REDACTED]
Postbus 9102
6525 EZ 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
AVD103002015220

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 25 september 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Targeting the prostaglanin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis' met aanvraagnummer AVD103002015220. 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. Voor aanvang van het project moet het daadwerkelijk benodigd aantal dieren per dierproef in overleg met de IvD worden vastgesteld. De reden hiervoor is dat u in de aanvraag heeft aangegeven dat het maximaal benodigd aantal dieren slechts een ruwe schatting is. Daarnaast dient u de eventuele go/no go momenten voor aanvang van het project in overleg met de IvD vast te stellen. Hoewel u in uw aanvraag wel heeft aangegeven dat er go/no go momenten zijn gedefinieerd, heeft u de criteria die zullen worden toegepast om tot een beslissing te komen over het wel of niet continueren van de verschillende dierproeven niet in uw aanvraag vermeld.

U kunt met uw project 'Targeting the prostaglanin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis' starten. De vergunning wordt afgegeven van 01 oktober 2015 tot 01 oktober 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons grotendeels vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. De CCD is echter van mening dat voor aanvang van het project zowel het benodigd aantal dieren als de criteria voor de go/no go momenten in overleg met de IvD dient te worden vastgesteld. Wij nemen de rest van het 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. 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: Postbus 9102
Postcode en woonplaats: 6525 EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 oktober 2015 tot 01 oktober 2020, voor het project project 'Targeting the prostaglanin E receptor 4 (EP4) with a new anti-rheumatic drug in arthritis' met aanvraagnummer AVD10300020152220, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Radboud Universiteit.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is de Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 14 augustus 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 14 augustus 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Antigen-induced arthritis	Muizen	200	Matig
Collagen-induced arthritis	Muizen	200	Matig
RA synovium SCID mouse	Muizen	150	Matig

Voorwaarden

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

-Voor aanvang van het project moet het daadwerkelijk benodigd aantal dieren per dierproef worden vastgesteld. De IvD dient in te stemmen met het daadwerkelijk benodigd aantal dieren.

-De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten voor aanvang van het project worden vastgesteld en dat de IvD instemt met de vastgestelde criteria.

-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 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 aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade

Datum
25 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015220

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
	NTS 20151221								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
5	Bijlage dierproeven 1				x		x	x	
6	Bijlage dierproeven 2				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Brief CCD 31-8			x					
10	Brief aanvrager 1-9				x		x	x	
11	Brief CCD 8-9			x					
12	Brief aanvrager 10-9				x		x	x	
13	E-mails 16-9				x		x		
14	Brief CCD 24-9			x					
15	E-mails 5-10				x		x		
16	Advies CCD		x						x
17	Beschikking en vergunning				x		x	x	

19 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 of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.
- Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie UMC Utrecht
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED]
KvK-nummer 3 0 2 4 4 1 9 7
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.
- Straat en huisnummer Instatie 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.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED] Dhr. Mw.
Functie arts-onderzoeker
Afdeling Chirurgie
Telefoonnummer [REDACTED]
E-mailadres [REDACTED]
- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters [REDACTED] Dhr. Mw.
Functie [REDACTED]
Afdeling [REDACTED]
Telefoonnummer [REDACTED]
E-mailadres [REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 _ 1 0 _ 2 0 1 5
- Einddatum 3 1 _ 0 9 _ 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Lange en korte termijn effecten van lokale verbranding van de alveeskliertumor
- 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 [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Utrecht

Datum 17-08-2015

Handtekening [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.
- 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.
-

Alvleesklierkanker is de 5e belangrijkste oorzaak van kanker-gerelateerde sterfte in Nederland. [1] Jaarlijks presenteren zich ongeveer 900 nieuwe patiënten met 'lokaal doorgroeide' alvleesklierkanker in Nederland. [1,2] Hierbij is de tumor buiten het pancreas doorgroeid rondom belangrijke bloedvaten, waardoor een operatieve verwijdering niet meer mogelijk is. De overlevingsduur van deze patiëntengroep is slechts 6-8 maanden.[1,3] De huidige behandelmogelijkheden zijn beperkt en geven een beperkte overlevingswinst. Momenteel is chemotherapie de standaardbehandeling, welke slechts een verlenging van de levensduur van 2 tot 3 maanden geeft.[4-7]

Vanwege de slechte prognose en de beperkte behandelingen voor deze patiëntengroep is er grote behoefte aan een nieuwe behandeling, die de overleving van deze patiënten significant kan verlengen.

De afgelopen jaren is er veel onderzoek gedaan naar radiofrequente ablatie (RFA) en irreversibele electroporatie (IRE) als behandeling voor deze patiëntengroep, zowel klinische als experimentele studies. De literatuur toont aan dat beide technieken veilig toepasbaar zijn en mogelijk een aanzienlijke winst kunnen geven van de overleving. [8] RFA is een techniek waarbij een of meerdere naalden in de tumor worden geplaatst. Er wordt stroom door de naalden gevoerd, waardoor er hitte ontstaat dat leidt tot verbranding van de tumorcellen. Op die manier wordt de tumor van binnenuit vernietigd. Het werkingsmechanisme berust daarmee op zogenaamde 'thermische schade'. IRE is daarentegen een techniek waarbij met behulp van elektrische pulsen kleine defecten in de celmembranen van de tumorcellen worden gemaakt, waardoor de cel in apoptose treedt [9-10]. Het is een techniek die niet is gebaseerd op temperatuur. Om die reden zouden er twee belangrijke voordelen zijn van IRE ten opzichte van RFA beschreven in de literatuur. Ten eerste zouden vaten en ductale structuren gespaard blijven omdat er geen thermische schade optreedt. Ten tweede speelt het zogenaamde 'heat sink' effect geen rol. [11-13] Dit is een verschijnsel waarbij het te ableren weefsel wordt gekoeld door de bloedstroom in aangrenzende vaten, waardoor de hoogte van de temperatuur voor een optimale ablatie niet wordt behaald ter plaatse. Hierdoor bestaat de kans dat tumorcellen die aan vaten grenzen niet (volledig) worden vernietigd.

In de literatuur worden verschillende technieken beschreven voor de toepassing van IRE. [14-16] Alle recente klinische en experimentele studies die IRE voor pancreastumoren beschrijven, maken gebruik van het plaatsen van naalden rondom de tumor in het pancreasweefsel.[8] De naalden vormen een elektrisch veld met elkaar, waardoor het weefsel dat zich binnen dit veld bevindt, wordt vernietigd. De naalden kunnen CT-geleide of met behulp van een laparotomie worden geplaatst.

Er zijn twee grote nadelen aan deze methode. Allereerst is één van de belangrijkste complicaties het ontstaan van pancreasfistels. De insteekplekken van de naalden geven een verhoogd risico op lekkage van pancreas enzymen naar de buikholte. Deze complicatie treedt op bij zowel RFA als IRE, gezien beide technieken voor de procedure naalden in het tumorweefsel plaatsen, met een incidentie van 3.0 – 5.6%. [17-19] De literatuur toont dat pancreasfistels een van de belangrijkste oorzaken zijn van postoperatieve sterfte.[20,21] De lekkage wordt veelal hersteld met een relaparotomie, waardoor pancreasfistels gepaard gaan met hogere morbiditeit en mortaliteit, verlengde ziekenhuisopname, verhoogde kosten en verminderde kwaliteit van leven. [20-23] Een tweede nadeel is dat IRE niet uitgevoerd kan worden als er geen elektrisch veld kan worden gecreëerd tussen de paren van naalden. Dit blijkt een belangrijk probleem bij patiënten, bij wie initieel een resectie is gepoogd uit te voeren. In het belang van de resectie zijn structuren grenzend aan de tumor vrij geprepareerd. Indien een resectie toch niet kan worden uitgevoerd, bestaat daardoor het risico dat het weefsel dat zich tussen de 2 naalden bevindt, is onderbroken. Een elektrisch veld kan in dat geval niet worden gegenereerd.

Referenties

1. Integraal kankercentrum Nederland (IKNL). Available from: www.cijfersoverkanker.nl
2. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet*. 2011 Aug 13;378(9791):607-20
3. Moss RA, Lee C. Current and emerging therapies for the treatment of pancreatic cancer. *OncoTargets and Therapy* 2010; 3: 111-127.
4. Asma Sultana, Catrin Tudur Smith, David Cunningham, Naureen Starling, John P. Neoptolemos, and Paula Ghaneh. Meta-Analyses of Chemotherapy for Locally Advanced and Metastatic Pancreatic Cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 20;25(18):2607
5. Louvet C, Labianca R, Hammel P. Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3509-16.
6. Rocha Lima CM, Green MR, Rotche R. Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate. *J Clin Oncol*. 2004 Sep 15;22(18):3776-83.
7. Poplin E, Feng Y, Berlin J. Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2009 Aug 10;27(23):3778-85
8. [REDACTED]
9. Coster HG. A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through." *Biophys J* 1965;5:669-86
10. Weaver JC, Vaughan TE, Chizmadzhev Y. Theory of skin electroporation: implications of straight-through aqueous pathway segments that connect adjacent corneocytes. *J Invest Dermatol* 1998;3:143-147
11. Daniel B. Brown, Govindarajan Narayanan. Interventional Radiology and the Pancreatic Cancer Patient; *Cancer J* 2012;18: 591Y601: November/December 2012
12. Hadjicostas P, Malakounides N, Varianos C, Kitiros E, Lerni F, Symeonides P. Radiofrequency ablation in pancreatic cancer. *HPB (Oxford)* 2006; 8:61-64.
13. Pezzilli R, Serra C, Ricci C, et al. Radiofrequency ablation for advanced ductal pancreatic carcinoma: is this approach beneficial for our patients? A systematic review. *Pancreas* 2011; 40:163-165.
14. Martin RCG, McFarland K, Ellis S, Velanovich V et al.; Irreversible Electroporation in Locally Advanced Pancreatic Cancer: Potential Improved Overall Survival; Aug 2012; *Ann Surg Oncol* DOI 10.1245/s10434-012-2736-1
15. Narayanan G, Hosein PJ, Arora G et al.; Percutaneous Irreversible Electroporation for Downstaging and Control of Unresectable Pancreatic Adenocarcinoma; *J Vasc Interv Radiol* 2012; 23:1613-1621
16. José A, Sobrevals L, Ivorra A et al; Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models; *Cancer Letters* 317 (2012) 16-23
17. Girelli R, Frigerio I, Giardino A, Regi P, Gobbo S, Malleo G et al. Results of 100 pancreatic radiofrequency ablations in the context of a multimodal strategy for stage III ductal adenocarcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 2013; 398: 63 – 69.
18. Cantore M, Girelli R, Mambri A, Frigerio I, Boz G, Salvia R et al. Combined modality treatment for patients with locally advanced pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2012; 99: 1083 – 1088.
19. Martin RC II, McFarland K, Ellis S, Velanovich V. Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: potential improved overall survival. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(Suppl 3): S443 – S449.
20. Bottger TC, Junginger T. Factors influencing morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy: critical analysis of 221 resections. *World J Surg* 1999; 23: 164 – 171
21. Bakkevdol KE, Kambestad B. Morbidity and mortality after radical and palliative pancreatic cancer surgery. Risk factors influencing the short-term results. *Ann Surg* 1993; 217: 356 – 368.
22. De Castro SM, Busch OR, van Gulik TM, Obertop H, Gouma DJ. Incidence and management of pancreatic leakage after pancreatoduodenectomy. *Br J Surg*. 2005 Sep;92(9):1117-23.
23. Enestvedt CK1, Diggs BS, Cassera MA, Hammill C, Hansen PD, Wolf RF. Complications nearly double the cost of care after pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg*. 2012 Sep;204(3):332-8. doi: 10.1016/j.amjsurg.2011.10.019. Epub 2012 Mar 29.
24. Neven K, van Driel V, van Wessel H, van Es R, du Pré B, Doevendans PA, Wittkamp F. Safety and feasibility of closed chest epicardial catheter ablation using electroporation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2014 Oct;7(5):913-9
25. Neven K, van Driel V, van Wessel H, van Es R, Doevendans PA, Wittkamp F. Epicardial linear electroporation ablation and lesion size. *Heart Rhythm*. 2014 Aug;11(8):1465-70.
26. Wittkamp FH, van Driel VJ, van Wessel H, Neven KG, Gründeman PF, Vink A, Loh P, Doevendans PA. Myocardial lesion depth with circular electroporation ablation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 2012 Jun 1;5(3):581-6

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?

3.3 Belang

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

In Nederland presenteren zich jaarlijks 900 patiënten met een lokaal irresectabel pancreascarcinoom. Dit aantal neemt de laatste jaren sterk toe. De algehele overleving van deze patiëntengroep is 7.9 maanden en behandelmogelijkheden zijn beperkt en geven bovenal slechts enkele maanden overlevingswinst. Het is van groot belang nieuwe behandelingen te ontwikkelen die tot een acceptabele verlenging van de levensduur leiden (tenminste 6 maanden) met een goede kwaliteit van leven.

De literatuur heeft aangetoond dat IRE mogelijk een dergelijk behandeling kan zijn. De methode waar IRE momenteel wordt uitgevoerd heeft echter 2 belangrijke nadelen. IRE kan slechts worden uitgevoerd indien een elektrisch veld kan worden gecreëerd tussen de paren van naalden. Dit blijkt in de praktijk

[Redacted text block]

Referenties:

1. Bower [M](#), [Sherwood L](#), [Li Y](#), [Martin R](#). Irreversible electroporation of the pancreas: definitive local therapy without systemic effects. [J Surg Oncol](#). 2011 Jul 1;104(1):22-8.
2. Charpentier [KP](#), [Wolf F](#), [Noble L](#), [Winn B](#), [Resnick M](#), [Dupuy DE](#). Irreversible electroporation of the pancreas in swine: a pilot study. [HPB \(Oxford\)](#). 2010 Jun;12(5):348-51
3. Fegrachi [S](#), [Molenaar IQ](#), [Klaessens JH](#), [Besselink MG](#), [Offerhaus JA](#), [van Hillegersberg R](#). Radiofrequency ablation of the pancreas: two-week follow-up in a porcine model. [Eur J Surg Oncol](#). 2014 Aug;40(8):1000-7
4. Martin RC II, McFarland K, Ellis S, Velanovich V. Irreversible electroporation in locally advanced pancreatic cancer: potential improved overall survival. [Ann Surg Oncol](#) 2013; **20**(Suppl 3): S443–S449.
5. Martin RC II, McFarland K, Ellis S, Velanovich V. Irreversible electroporation therapy in the management of locally advanced pancreatic adenocarcinoma. [J Am Coll Surg](#) 2012; **215**: 361–369.

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

Dierproef 1: varkens worden behandeld met IRE- [Redacted] blijven 2 weken overleven en complicaties worden vervolgd over tijd

Dierproef 2: varkens worden behandeld met IRE- [Redacted] nadat er een metalen stent in de galgang is ingebracht.

In beide proeven wordt een pancreatectomie tbv histologisch onderzoek verricht

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.

Afhankelijk van de uitkomst van de eerste dierproef, waarbij de veiligheid wordt vastgesteld, zal dierproef 2 worden uitgevoerd. Dat een vervolgstap betreft indien de techniek veilig toepasbaar is.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Lange termijn studie - varkensmodel, zie bijgevoegde beschrijving
2	Effecten van een metalen [REDACTED] [REDACTED] - varkensmodel, zie bijgevoegde beschrijving
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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | De veiligheid van een nieuwe behandeling van alveeskliekkanker
-
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
-
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Alvleeskliertumor; nieuwe behandeling; complicaties; effecten
-

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project. Fundamenteel onderzoek
-
- Translationeel of toegepast onderzoek
-
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
-
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.* 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)
- In Nederland krijgen ieder jaar ongeveer 900 patiënten te horen dat ze een vorm van alvleesklierkanker hebben, die niet kan worden geopereerd. De huidige behandelingen zijn beperkt en geven slechts een verlenging van de levensduur van twee tot drie maanden. De gemiddelde levensverwachting van een patiënt met deze vorm van alvleesklierkanker is zes tot acht maanden. Vanwege de beperkte behandelmogelijkheden en de slechte vooruitzichten voor deze patiënten is er grote behoefte aan een nieuwe behandeling.
- Een mogelijke nieuwe behandeling is irreversibele electroporatie (IRE). Dit is een techniek waarbij met behulp van elektrische pulsen gaatjes worden gemaakt in de tumorcellen van de alvleeskliertumor, waardoor die worden vernietigd en doodgaan. In twee eerdere onderzoeken is aangetoond dat deze techniek kan leiden tot het vernietigen van de cellen in de alvleesklier. Met ons huidige onderzoek willen we kijken of de techniek veilig is.
-
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- Met deze dierenproeven willen we onderzoeken of de techniek veilig is door varkens te behandelen met IRE, twee weken te laten overleven en te kijken of er complicaties optreden en/of ze ziek worden. We doen onderzoek naar de grootte van het gebied dat wordt vernietigd en naar de effecten op bloedvaten en galwegen die in en rondom het gebied lopen. Ook onderzoeken we wat de effecten zijn van een metalen buisje in de galgang. Patiënten met een alvleeskliertumor krijgen zo'n metalen buisje wanneer ze last hebben van geelzucht. Het is belangrijk te weten of ook die mensen de nieuwe behandeling kunnen ondergaan. Tenslotte willen we de betrouwbaarheid van de beeldvorming onderzoeken door de meting van de grootte op beeldvorming te vergelijken met de werkelijke grootte van de tumor.
- Op deze manier hopen we bij te dragen aan het ontwikkelen van een nieuwe behandeling voor patiënten met een vorm van alvleesklierkanker die niet kan worden geopereerd.
-
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- 112 varkens (84 varkens voor proef 1 en 28 varkens voor proef 2).
-
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- De varkens zullen stress ervaren voor en na het toedienen van de verdoving voor de operatie. We verwachten dat ze direct na de operatie pijn zullen ervaren van de buikwond. Die pijn zullen we verlichten met morfinepleisters. Afhankelijk van de complicaties die optreden kunnen de dieren gedurende de twee weken pijn, stress, verandering in gewicht, conditie en eetlust ervaren. De

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

verwachting is dat dat slechts bij een enkel proefdier het geval zal zijn.

Dierproef 1: matig 100%

Dierproef 2: matig 100%

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De proefdieren worden na de proef voor andere onderzoeks- of onderwijsdoeleinden aangeboden.

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.

Voordat we de behandeling op mensen kunnen toepassen moeten we eerst bij proefdieren testen of de behandeling veilig is. Daarvoor is het van belang dat de varkens twee weken in leven worden gehouden, omdat we pas dan kunnen onderzoeken of er complicaties optreden na de behandeling. De IRE-behandeling is alleen werkzaam in levende dieren.

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

Door drie vraagstellingen in één dierproef te testen, hebben we het aantal al kunnen terugdringen. De effecten van het metalen buisje moeten we in een aparte dierproef testen, omdat dat mogelijk de veiligheid van de behandeling kan beïnvloeden, terwijl we de veiligheid nu juist willen onderzoeken in die studie.

4.3 **Verfijning**

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

Het spijsverteringskanaal van het varken is vergelijkbaar met dat van de mens, waardoor het mogelijk is de resultaten te vertalen naar behandeling van mensen. Bovendien zijn de eerdere studies ook gedaan bij varkens, waardoor we kunnen voortborduren op deze eerdere studies en we uitkomsten kunnen vergelijken.

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

We zullen de varkens dagelijks controleren op welzijn, temperatuur, gewicht, en bloedwaarden. Indien dit afwijkt zullen we daar direct op handelen. De varkens worden in groepen gehuisvest tot de operatie. Na de operatie worden ze apart van elkaar gehuisvest. Dit is omdat ze een infuus in het bloedvat in de nek krijgen, zodat om de dag bloed afgenomen kan worden, wat minder pijnlijk en belastend zal zijn, dan telkens in het oor. Om te voorkomen dat de varkens elkaars infuus eruit gaan trekken is het van belang ze de twee weken na de operatie alleen te huisvesten

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



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.
- 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="Varkensstudie: veiligheid en effecten van IRE ████████ in het pancreas"/> |

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.

[Redacted text block]

- [Redacted list item]
- [Redacted list item]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

B. De dieren

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

Varkens, gewicht van 60-70 kg, aantal: $14 + 84 = 98$, geen voorkeur voor geslacht, geen specifieke voorkeur voor ras/stam en leverancier

De reden dat we voor het varken als proefdier hebben gekozen is omdat het spijsverteringskanaal van het varken veel overeenkomsten met die van de mens heeft. Gezien we de techniek uiteindelijk willen gaan toepassen in de mens is het van belang de resultaten van de dierenstudies te kunnen extrapoleren naar de mens. In onze eerdere proeven hebben wij bewust gekozen voor varkens met een gewicht van 60-70 kg, omdat het volume van het pancreas dan groter is, waardoor we meer pancreasweefsel hadden om te ableren en het aantal vonken dat optrad (stroomverlies) significant lager uitviel en daarmee de data betrouwbaarder waren.

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 van het type dier is niet wenselijk, omdat het varken een vergelijkbaar spijsverteringskanaal heeft als de mens. Om de uitkomsten van het experiment te kunnen vertalen naar de mens is het van belang varkens te gebruiken voor de experimenten. Daarnaast is het van belang het varkens 2 weken in leven te houden, om meerdere redenen:

- Om een uitspraak te kunnen doen over de veiligheid van de techniek. Die kan worden vastgesteld door de complicaties over tijd te vervolgen.
- Irreversibele electroporatie is een proces dat ontstaat door allerlei fysiologische reacties in het lichaam. De kleine openingen in de celmembranen van tumorcellen ontstaan doordat processen in het lichaam worden geactiveerd, die celdood bevorderen dat leidt tot necrose van de tumorcellen. Dit proces doet zich slechts voor in een levend wezen
- Bovendien is het een proces waarvan de uitwerking nog enkele uren doorwerkt. Het verder voortschrijden van de necrose doet zich alleen voor in levend weefsel. Het langdurige proces maakt dat het voor het vaststellen van de veiligheid van de belang is het varken langere tijd te vervolgen, om de effecten van eventuele uitbreiding van de ablatie zone over tijd te kunnen observeren.

Vermindering. We hebben er bewust voor gekozen meerdere testen uit te voeren in 1 proefdier. Met dit ene experiment kunnen we 3 vraagstellingen beantwoorden. Door in onze eerder studies de instellingen voor het creëren van een ablatie vast te stellen en te optimaliseren, zijn wij met deze proeven verzekerd dat een ablatie kan worden vervaardigd en er geen 'verspilling' van proefdieren zal ontstaan, doordat de ablatie niet succesvol is. Het aantal van 7 varkens is vastgesteld aan de hand van eerdere studies met een vergelijkbare opzet, vraagstelling en eindpunt, waarbij we 10% uitval hebben meegerekend.

Verfijning. De reden dat we voor het varken als proefdier hebben gekozen is omdat het spijsverteringskanaal van het varken veel overeenkomsten met die van de mens heeft. Gezien we de techniek uiteindelijk willen gaan toepassen in de mens is het van belang de resultaten van de dierenstudies te kunnen extrapoleren naar de mens. Gedurende de twee weken dat de varkens zijn gehuisvest, zal dagelijks het welzijn van de dieren worden beoordeeld. Indien er complicaties zijn of de dieren in minder goede conditie zijn (minder eten, kwijlen, minder actief etc.) zal hier direct actie op worden ondernomen om dit te verbeteren. Met behulp van de bloedmetingen op dag 1,3,5,7 en 14 na de behandeling kunnen we het optreden van eventuele complicaties gemakkelijker opsporen en daar direct op anticiperen. Dit geldt ook voor het dagelijks meten van het gewicht en temperatuur.

De reden dat wij niet gebruik maken van varkens die voor onderwijs of onderzoek worden gebruikt is dat het primaire eindpunt veiligheid betreft. Om die reden is het van belang dat de uitkomsten niet worden beïnvloed door andere/eerdere verrichtingen aan het varken, zoals toename van belasting of afname van conditie, die directe gevolgen hebben voor het primaire eindpunt. Tevens onderzoeken wij de vitaliteit van de vaten en ducti, waarbij het van belang is dat eerdere onderzoeken ten behoeve van onderwijs/onderzoek geen effect hebben op de bloeddorstroom van het pancreas.

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.

Zie hierboven

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

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 valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding


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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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


Het onder anesthesie brengen van de varkens is een stressvol moment. Het is echter van geringe aard en korte duur, doordat de anesthesie, die intramusculair en intraveneus wordt toegediend, vrij snel zijn uitwerking heeft. Tijdens de procedure is het varken onder anesthesie en zal het geen tot geringe pijn voelen. Er wordt ook direct geanticipeerd op pijn, wanneer die wordt geregistreerd tijdens de procedure, bijvoorbeeld bij een toename van de hartfrequentie.

Follow-up duur

De eerste dagen na de operatie zal de pijn meer zijn, vanwege de buik wond die nog moet herstellen. Dit zal ondervangen worden door Rimadyl 4mg iv toe te dienen en indien nodig extra morfinepleister eraan toe te voegen. Gezien slechts een deel van het pancreas wordt geablateerd is de verwachting dat varkens geen klachten zullen ondervinden van het feit dat een deel van het pancreas niet meer werkzaam is. De pijn zal afnemen in de loop van de dagen na de operatie, doordat de wond geneest en het varken zich herstelt van de operatie. Afhankelijk van de complicaties die optreden zal de pijn variëren van pijnvrij tot matige pijn. Afhankelijk van de pijnklachten zal daarop ingespeeld worden met morfinepleisters of aanvullende pijn verlichtende medicatie

Pancreatectomie

Om de pancreatectomie te kunnen uitvoeren worden de varkens opnieuw onder narcose gebracht, hetgeen een stressvol gebeurtenis betreft. Dit leidt tot gering ongerief van de proefdieren.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het ontstaan van complicaties kan het welzijn van de proefdieren aantasten. Bekende complicaties van IRE zijn: vena porta trombose, ascites, wond infectie, bloeding, duodenum perforatie, gallekkage en pancreasfistel.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Door effecten op de vaatwand zou een trombus kunnen ontstaan, deze trombus kan leiden tot ascites. Ascites is daarentegen ook een bekend verschijnsel na een buikoperatie, door de ontstekingsreactie die optreedt als afweer tegen de operatie. Wondinfectie en bloeding zijn standaard complicaties die ten gevolge van een operatie kunnen ontstaan. Een duodenum perforatie, gallekkage en pancreasfistel zijn gerelateerd aan de ablatie. Door de irreversibele electroporatie kunnen ook andere cellen beschadigd raken met een perforatie of lekkage tot gevolg.

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

Om deze complicaties te minimaliseren worden de optimale instellingen gebruikt voor het genereren van een ablatie, zodat er niet onnodig hoeveelheid stroom door het pancreas wordt gevoerd. Tevens wordt het klinisch beeld, temperatuur en gewicht dagelijks vastgesteld, zodat als deze afwijkend is er direct op geanticipeerd kan worden. Dit geldt ook voor de bloedmetingen, die onderliggende lijden kunnen aantonen.

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.

Dagelijks worden de klinische verschijnselen geobserveerd en bijgehouden in een welzijnsdagboek, bestaande uit: algehele conditie, gedrag, houding, activiteit, voedsel inname, verzorgingstoestand, ontlasting, ademhaling, wondgenezing, progressieve ascitesvorming en peritonitis. Alle items worden gescoord van 0 tot 2 (0 = normaal, 1 = matig en 2 = slecht). Indien een varken een score heeft van 7 zal het humane eindpunt zijn bereikt. Tevens wordt de temperatuur gemeten.

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

De verwachting is, gebaseerd op de literatuur, zal bij maximaal 1 varken het ongerief zo ernstig zijn dat het humane eindpunt wordt bereikt.

K. Classificatie van ongerief

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

matig

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



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.
- 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="2"/> | <input type="text" value="Varkensstudie: veiligheid en effecten van IRE- in het pancreas met galgangstent"/> |

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.

[Redacted text block containing multiple paragraphs of blacked-out content]

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

[Redacted text block]

B. De dieren

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

Varkens, gewicht van 60-70 kg, aantal: 28, geen voorkeur voor geslacht, geen specifieke voorkeur voor ras/stam en leverancier

De reden dat we voor het varken als proefdier hebben gekozen is omdat het spijsverteringskanaal van het varken veel overeenkomsten met die van de mens heeft. Gezien we de techniek uiteindelijk willen gaan toepassen in de mens is het van belang de resultaten van de dierenstudies te kunnen extrapoleren naar de mens. In onze eerdere proeven hebben wij bewust gekozen voor varkens met een gewicht van 60-70 kg, omdat het volume van het pancreas dan groter is, waardoor we meer pancreasweefsel hadden om te ableren en het aantal vonken dat optrad (stroomverlies) significant lager uitviel en daarmee de data betrouwbaarder waren.

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 van het type dier is niet wenselijk, omdat het varken een vergelijkbaar spijsverteringskanaal heeft als de mens. Om de uitkomsten van het experiment te kunnen vertalen naar de mens is het van belang varkens te gebruiken voor de experimenten.

Irreversibele electroporatie is een proces dat ontstaat door allerlei fysiologische reacties in het lichaam. De kleine openingen in de celmembranen van tumorcellen ontstaan doordat processen in het lichaam worden geactiveerd, die celdood bevorderen dat leidt tot necrose van de tumorcellen. Dit proces doet zich alleen voor in een levend wezen

Vermindering. Het was niet mogelijk deze vraagstelling te combineren met dierproef met volgnummer 3.4.4.1, omdat de effecten van de aanwezigheid van een metalen stent niet bekend zijn en daarmee de veiligheid van de toepassing van IRE-XXXXXXXXXX zou kunnen beïnvloeden, terwijl dat het primaire eindpunt betrof. Door in onze eerder studies de instellingen voor het creëren van een ablatie vast te stellen en te optimaliseren, zijn wij met deze proeven verzekerd dat een ablatie kan worden vervaardigd en er geen 'verspilling' van proefdieren zal ontstaan, doordat de ablatie niet succesvol is. Om die reden kunnen we ook vaststellen dat als een ablatie niet succesvol is dat dit mogelijk te relateren is aan de metalen stent.

Verfijning. De reden dat we voor het varken als proefdier hebben gekozen is omdat het spijsverteringskanaal van het varken veel overeenkomsten met die van

de mens heeft. Gezien we de techniek uiteindelijk willen gaan toepassen in de mens is het van belang de resultaten van de dierenstudies te kunnen extrapoleren naar de mens.

Deze proef kan niet geïmplementeerd worden in dierproef 1, omdat de effecten van de stent niet eerder zijn onderzocht. Gezien dierproef 1 een veiligheidsstudie betreft, zou de aanwezigheid van een stent de veiligheid kunnen beïnvloeden.

De reden dat wij niet gebruik maken van varkens die voor onderwijs of onderzoek worden gebruikt is dat het varken tenminste 5 uur na ablatie moet overleven om het effect van de stent op het weefsel, vaten en ducti te onderzoeken, waarbij het van belang is dat de bloeddorstroom rondom het behandelde gebied van het pancreas niet beïnvloed wordt door andere/verdere verrichtingen aan het varken ten behoeve van onderzoek of onderwijs.

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.

Zie hierboven

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

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 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.

IRE-XXXXXXXXXX procedure

Het onder anesthesie brengen van de varkens is een stressvol moment. Het is echter van geringe aard en korte duur, doordat de anesthesie, die intramusculair en intraveneus wordt toegediend, vrij snel zijn uitwerking heeft. Tijdens de procedure is het varken onder anesthesie en zal het geen tot geringe pijn ervaren. Er wordt ook direct geanticipeerd op pijn, wanneer die wordt geregistreerd tijdens de procedure, bijvoorbeeld bij een toename van de hartfrequentie.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wij voorzien geen andere vormen van welzijnsaantasting met de dierenproef

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Dit kan zich voordoen tijdens de acclimatisatieperiode. Tijdens die periode zal dagelijks de klinische verschijnselen worden geobserveerd en bijgehouden in een welzijnsdagboek, bestaande uit: algehele conditie, gedrag, houding, activiteit, voedsel inname, verzorgingstoestand, ontlasting en ademhaling. Alle items worden gescoord van 0 tot 2 (0 = normaal, 1 = matig en 2 = slecht). Indien een varken een score heeft van 7 zal het humane eindpunt zijn bereikt.

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.

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.512.024
2. Titel van het project : Irreversibele electroporese van het pancreas van het varken: lange en korte termijn uitkomsten en optimaliseren van de instellingen
3. Titel van de NTS : De veiligheid van een nieuwe behandeling van alvleesklierkanker

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: 25-06-2015
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 08-07-2015
- anderszins behandeld: per email 16-07-2015
- termijnonderbreking(en) van / tot : 14-07-2015 tot 16-07-2015 en
03-08-2015 tot 14-08-2015
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 14-08-2014

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:

Projectvoorstel

- 3.4 onderzoeksstrategie: De DEC vraagt zich af of twee weken observatie niet wat kort is. Graag toelichten.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U spreekt over 12+2 varkens, maar rekent vervolgens steeds met 12 varkens. Graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u toe te lichten waarop de 10% uitval is gebaseerd en het daarbij behorende ongerief te noemen.

Bijlage 2

- L. Wijze van doden: De DEC verzoekt u de eerste 'ja' toe te lichten.

- Datum: 03-08-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

Bijlage 1

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: In bijlage 2 geeft u aan dat u geen surplus varkens uit onderwijs of onderzoek kunt gebruiken omdat het varken tenminste 5 uur na ablatie moet overleven om het effect van de stent op het weefsel, vaten en ducti te onderzoeken, waarbij het van belang is dat de bloeddorstroom rondom het behandelde gebied van het pancreas niet beïnvloed wordt door andere/verdere verrichtingen aan het varken ten behoeve van onderzoek of onderwijs.

In bijlage 1 zegt u hier niets over. Betekent dit dat er in bijlage 1 wel surplus varkens kunnen worden gebruikt? Graag aangeven in de bijlage + motivatie waarom wel/niet.

- Datum antwoord: 16-07-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Projectvoorstel

- Uit de literatuur is gebleken dat de complicaties die kunnen optreden na IRE, zich voordoen in de eerste dagen na de ingreep. Klinische studies tonen dat patiënten gemiddeld 7-9 dagen na de procedure van IRE met ontslag gaan, waarbij de complicaties voor die datum zijn hersteld.[1,2] Experimentele studies, waarbij varkens zijn behandeld met IRE en twee weken in leven zijn gehouden, toonden dat de effecten van de procedure de eerste uren na de procedure optraden en na 24 uur waren hersteld.[3-5] De complicaties die wij verwachten te zien bij deze dierproef zijn postoperatieve bloeding, wondinfectie, pancreasfistel, pancreatitis, duodenum perforatie, ileus en/of ascites. Dit zijn alle acute complicaties, die direct na de procedure worden verwacht, zoals tevens in de literatuur is aangetoond. Om de data te kunnen vergelijken met eerdere vergelijkbare

dierenproeven, hanteren wij de twee weken voor het vervolgen van de effecten op de proefdieren.

Bovenstaande is als zodanig aangepast in het "Projectvoorstel, onder 3.4.1, onder het kopje 'dierproef 1'" als ook in bijlage 1 "Beschrijving dierproeven 3.4.4.1, onderdeel A"

Bijlage 1

- Het aantal dieren is aangepast in alle documenten. Voor de experimenten in dierproef 1 en 2 zijn telkens 14 varkens nodig. Binnen dierproef 1 zullen wij eerst de veiligheid van de techniek vaststellen met behulp van 14 varkens. Indien de veiligheid wordt aangetoond is de verwachting dat er nog 4 tot 6 vergelijkbare proeven worden uitgevoerd om de toepassing van de techniek te optimaliseren, ten behoeve van de klinische toepassing, waarvoor tevens 14 varkens per experiment nodig zijn = maximaal $7 \times 14 = 98$. Tezamen met dierproef 2 zijn dat $98 + 14 = 112$ varkens.
Bovenstaande is aangepast in beide bijlagen als ook in de NTS.
- Uit een eerdere studie van onze werkgroep hebben wij geleerd dat het niet ondenkbaar is dat er extra proefdieren nodig zijn. Zo is het van belang dat de varkens een gewicht hebben van 65-70kg alvorens zij op tafel komen te liggen. Alleen dan is het pancreas van een dusdanig formaat dat de techniek toepasbaar is. Tijdens een eerdere studie is het voorgekomen dat varkens zijn verwisseld en twee lichterè varkens op onze operatietafel terecht zijn gekomen. Bij laparotomie bleek dat het pancreas van beide te klein was, waarna de fout is geconstateerd door het GDL en de varkens een open-dicht-procedure hebben ondergaan. Om voldoende data te verzamelen om een uitspraak te kunnen doen over de resultaten zijn toen om die reden extra proefdieren aangevraagd met behulp van een kleine wijziging. In dit specifieke geval was het ongerief gering, doordat het proefdier eenmalig stress heeft ondervonden van het onder narcose brengen en aansluitend is getermineerd. Tevens hebben wij gezien dat het kan gebeuren dat een varken komt te overlijden gedurende de acclimatisatieperiode of gedurende narcose, ook dan is het van belang dat er extra proefdieren beschikbaar zijn. Het ongerief was ernstig, waardoor het proefdier is komen te overlijden. Dit was echter niet door toedoen van het experiment.

Bijlage 2

- In overleg met het gemeenschappelijk dierenlaboratorium is nu voor zowel bijlage 1 als 2 het vakje 'nee' aangevinkt. De varkens kunnen niet voor onze eigen doeleinden worden herbruikt. Dat betekent uiteraard niet dat zij niet gebruikt kunnen worden voor andere onderzoeken. Om die reden zullen wij en het gemeenschappelijk dierenlaboratorium actief andere onderzoeksgroepen informeren over de gebruikte proefdieren, waarvan mogelijk nog de organen en vaten kunnen worden gebruikt of mogelijk zelfs het totale dier.

- Datum antwoord: 14-08-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):

Bijlage 1

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Voor beide dierproeven kunnen wij geen gebruik maken van surplus dieren. Voor dierproef 1 is de voornaamste reden het primaire eindpunt: veiligheid. Om die reden is het van belang dat het proefdier geen eerdere handelingen heeft ondergaan die van invloed kunnen zijn op de uitkomst (morbiditeit, mortaliteit). Voor de secundaire eindpunten van dierproef 1 geldt hetzelfde als voor dierproef 2. Dat ook voor deze studie geen surplus dieren gebruikt kunnen worden, omdat eerdere verrichtingen de bloeddorstroming van het pancreas kunnen beïnvloeden en daarmee mogelijk een effect kunnen hebben op de uitkomsten.

- 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, het onderzoek kan bijdragen aan een nieuwe (standaard) behandeling voor patiënten

met een lokaal irresectabel pancreascarcinoom. Jaarlijks worden in Nederland ca. 900 patiënten gediagnosticeerd met een vorm van alvleesklierkanker die niet kan worden geopereerd. Alternatieve behandelingen zijn beperkt en geven slechts een geringe verlenging van de levensduur. Vanwege de beperkte behandelmogelijkheden en de slechte vooruitzichten voor deze patiënten is er grote behoefte aan een nieuwe behandeling. Door middel van deze translationele studie kan onderzocht worden of het toepassen van de nieuwe behandeling irreversibele electroporatie (IRE) met behulp van metalen [REDACTED] een veilig toepasbare techniek is.

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. In bijlage 1 is het ongerief ingeschat als matig vanwege meerdere bloedafnames, het onder narcose uitvoeren van de ablatie, het laten overleven van de varkens gedurende twee weken en het opnieuw onder (terminale) narcose ableren van de varkens. In de tweede bijlage worden de varkens eveneens geableerd, maar na de procedure slechts 5 a 6 uur in leven gehouden onder narcose. Omdat de varkens niet bijkomen uit de narcose is hier sprake van terminaal ongerief. 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 de veiligheid van een nieuwe behandeling, het toepassen van irreversibele electroporatie, voor patiënten met een lokaal irresectabel pancreascarcinoom bepaald. Vanwege de risico's is het niet mogelijk dit experiment direct in mensen uit te voeren. Daarnaast is irreversibele electroporatie een proces dat ontstaat door allerlei fysiologische reacties in het lichaam. Het veroorzaakt kleine openingen in de celmembran van tumorcellen doordat processen in het lichaam worden geactiveerd die celdood bevorderen, wat leidt tot

necrose van de tumorcellen. Dit proces doet zich alleen voor in een levend wezen en werkt bovendien nog enkele uren door. Het verder voortschrijden van de necrose doet zich eveneens alleen voor in levend weefsel. Om deze redenen is het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

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. Het aantal benodigde dieren is, in overleg met een biostatisticus, benaderd vanuit een pilotopzet. Daarbij is gebruik gemaakt van ervaringen uit eerdere studies met een vergelijkbare opzet, vraagstelling en eindpunt en is rekening gehouden met een uitvalspercentage van 10%. Voor bijlage 1 geldt nog dat voor de optimalisatie studies de uitkomsten van eerder uitgevoerde studies gebruikt worden om een powerberekening te maken, hetgeen het aantal varkens zou kunnen verminderen. Door de opzet in bijlage 1 kunnen meerdere experimenten in één dier gedaan worden, zodat er minder dieren nodig zijn. Het is niet mogelijk de experimenten in bijlage 1 en 2 te combineren, omdat de effecten van de stent niet eerder zijn onderzocht en de stent de veiligheid van de experimenten (veiligheidsstudies) in bijlage 1 zou kunnen beïnvloeden. Voor beide bijlagen geldt dat in eerdere studies de instellingen voor het creëren van een ablatie zijn vastgesteld en geoptimaliseerd. Er zullen dus geen dieren 'verspild' worden omdat een ablatie niet vervaardigd kan worden. Mocht een ablatie in bijlage 2 toch niet succesvol zijn dan is dat waarschijnlijk te relateren aan de metalen stent. Het is in beide bijlagen helaas niet mogelijk om surplus dieren te gebruiken. Om het effect van de stent op het weefsel, vaten en ducti te onderzoeken is het van belang dat de dieren experimenteel naïef zijn. 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 in bijlage 1 worden de dieren dagelijks intensief gecontroleerd door ervaren onderzoekers en zal adequate pijnbestrijding worden toegepast. Ook kunnen aan de hand van de bloedmetingen op diverse tijdstippen complicaties makkelijker opgespoord worden. Bij complicaties of bij constatering van mindere conditie van de dieren zal direct actie worden ondernomen. Er wordt gebruik gemaakt van varkens omdat het spijsverteringskanaal van het varken 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 uitkomsten vergeleken kunnen worden.
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 testen van de veiligheid van irreversibele electroporatie (IRE), een nieuwe techniek voor de behandeling van alveesklieerkanker, substantieel is.

Als gevolg van de bloedafnames, ablatie onder anesthesie, het laten overleven van de varkens gedurende 2 weken en het opnieuw ableren onder terminale anesthesie treedt in bijlage 1 weliswaar matig ongerief en in bijlage 2 vanwege ablatie onder terminale anesthesie terminaal 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 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 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.



> 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
AVD115002015221

Bijlagen
2

Datum 18-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 augustus 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015221. 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. 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: mevrouw [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 oktober 2015
Geplande einddatum: 30 september 2020
Titel project: Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten
Titel niet-technische samenvatting: Lange en korte termijn effecten van lokale verbranding van de alveeskiertumor
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: Utrecht
Datum: 17 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
AVD115002015221

Bijlagen

2

Datum 18-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 18 augustus 2015

Vervaldatum: 17 september 2015

Factuurnummer: 201570221

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015221	€ 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. Instantie voor dierenwelzijn
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
AVD115002015221

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 31 augustus 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten" met aanvraagnummer AVD115002015221. 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

- 1) Wij hebben de indruk dat de bij de CCD ingediende versie van uw projectaanvraag (met bijbehorende documenten) niet de aangepaste versie is na vragen van de DEC. Bijvoorbeeld: de dieraantallen op verschillende plekken in de aanvraag zijn niet consistent (in de NTS, bijlage 1 onder kopje "vermindering" en kopje B van bijlage 1 worden verschillende aantallen genoemd) dieren. In het DEC advies wordt gesproken over 112 (dierproef 1) respectievelijk 98 (dierproef 2) dieren.
- 2) De onderbouwing van het aantal dieren is niet voldoende navolgbaar gemotiveerd. U verwijst naar literatuur met vergelijkbare studies waarin 4-6 dieren zijn gebruikt. Het is onduidelijk waarom u in dierproef 1 twaalf dieren nodig heeft, terwijl u voor een vergelijkbare vraagstelling in dierproef 2 aan zes dieren per groep voldoende heeft.
- 3) U noemt kort vervolgstudies ten behoeve van de optimalisatie en verfijning van de techniek. Valt deze optimalisatie ook onder dit project of volgt hier een nieuwe aanvraag voor? Indien deze optimalisatie ook onder dit project valt, graag deze optimalisatie verder uitleggen en de benodigde dieraantallen onderbouwen.

4) Bij zowel bijlage 1 als bijlage 2 is bij vraag L niet aangegeven waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Datum

31 augustus 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015221

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

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
- 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:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Naam		
Datum	-	- 20
Handtekening		

Betreft: Reactie op brief 'Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven'
Project: Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten
Nummer: AVD115002015221

1 september 2015, Utrecht

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Graag reageren wij op de onduidelijkheden die u beschreef in uw brief, die wij op 31 augustus jl hebben mogen ontvangen:

1. De dieraantallen verschillen per document

Uw vermoeden dat de documenten, die u heeft toegestuurd gekregen, niet de aangepaste versies zijn na de vragen van de DEC, is correct. Bijgevoegd treft u de juiste documenten met daarin de correcte aantallen, die overeenkomen in de verschillende stukken.

2. De onderbouwing van het aantal dieren is niet voldoende navolgbaar

Voor het vaststellen van de aantallen is advies ingewonnen bij een statisticus. Zij gaf aan dat het niet mogelijk was statistiek te bedrijven op dierproef 2, omdat de uitkomstparameter niet te kwantificeren is. Haar advies was het te benaderen als een *pilot study*. Om die reden zullen wij beide proeven (stent centraal en stent perifeer) met ieder 12 varkens uitvoeren, met een uitvalspercentage van 10%. Dit hebben wij als zodanig aangepast in de 'Beschrijving dierproeven 3.4.4.2' onder Kopje A en B. Dit betekent dat wij met het huidige project een maximum van $98 + 28$ (ipv 14) = 126 varkens verwachten nodig te hebben. Door deze verandering komt het dieraantal dat wordt genoemd op pagina 3 van het document van de DEC met de bestandsnaam '2015.II.512.024. [REDACTED].8juli.pdf' niet meer overeen. Daar wordt nog het oude aantal ($98+14=112$) genoemd.

3. Vallen de optimalisatie en verfijning proeven ook onder het huidige project? Zo ja, dan verder uitleg plus onderbouwing van de dieraantallen.

De optimalisatie en verfijningsproeven vallen onder het huidige project, maar zullen slechts worden uitgevoerd als de veiligheid is aangetoond. In 'Beschrijving proefdieren 3.4.4.1' hebben wij onder kopje A enkele vraagstellingen beschreven die dan zullen worden onderzocht. Het zijn vraagstellingen die aanpalend zijn aan het huidige project, omdat zij een vertaling naar kliniek en toepassing in klinisch onderzoek mogelijk maken.

4. Aangeven waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef

Dit stond nog opgenomen in een oudere versie, die u heeft ontvangen. Wij hebben dat echter eerder al herzien naar aanleiding van een van de vragen van de DEC. De argumentatie staat beschreven in de laatste alinea van pagina 3 van het document '2015.II.512.024. [REDACTED].8juli.pdf'. Er is dus geen sprake van het doden van de proefdieren als eindpunt.

Wij hopen hiermee u vragen voldoende te hebben beantwoord. Wij zien uw reactie graag tegemoet.

Alvast dank.

Hartelijke groet,

Mede namens onze onderzoeksgroep,

[REDACTED]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn
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
AVD115002015221

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 08 september 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten" met aanvraagnummer AVD115002015221. 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

- 1) In Bijlage Beschrijving dierproeven 1 beschrijft u onder A een aantal andere vraagstellingen ten behoeve van de optimalisatie en verfijning van de techniek. Het is ons niet helder of de varkens voor deze vervolgvragen nog andere behandelingen ondergaan dan enkel de IRE. Hoe kunt u de vragen zoals beschreven onder A beantwoorden zonder de dieren bijvoorbeeld een tumor te geven met al dan niet grote vaten in het centrum van de tumor?
- 2) Kunt u de go no-go momenten beschrijven? Op basis waarvan wordt besloten wat de vervollexperimenten zijn?
- 3) In uw antwoorden op onze brief van 31 augustus 2015, en in uw nieuwe aanvraag, geeft u aan dat de dieren niet gedood zullen worden als onderdeel van of na afloop van het experiment. Echter, in de beschrijving onder A, bij zowel Beschrijving dierproeven 1 als 2, schrijft u dat de dieren zullen worden getermineerd. Kunt u dit consistent maken?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

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.

Datum

08 september 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015221

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

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
- 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

Betreft: Reactie op brief 'Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven' van 8-9-2015
Project: Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten
Nummer: AVD115002015221

10 september 2015, Utrecht

Geachte leden van de Centrale Commissie Dierproeven,

Graag reageren wij op de onduidelijkheden die u beschreef in uw brief, die wij op 8 september jl hebben mogen ontvangen:

1. Ondergaan de proefdieren voor de vervolgvragen nog andere behandelingen dan enkel de IRE?
Hoe kunt u de vragen beantwoorden zonder de dieren een tumor te geven met al dan niet grote vaten in het centrum van de tumor?

Voor de beantwoording van de vervolgvraagstellingen beschreven in Bijlage Beschrijving dierproeven 1 onder A, zullen de proefdieren enkel worden behandeld met IRE. Er zullen geen aanvullende behandelingen worden uitgevoerd. Dit hebben verduidelijkt met de toevoeging: *Deze vervolgstudies worden op dezelfde manier als bovenstaande proef uitgevoerd, echter zal weefsel dat direct aan het pancreas grenst (bijv duodenum, maag of omliggende vaten) extra worden behandeld met* [REDACTED]

Ook zal er geen tumor in de proefdieren worden geïntroduceerd. Vraagstelling 1 'Is [REDACTED] [REDACTED]?' is daarbij misleidend. Om die reden hebben we de vraagstelling aangepast: *Wat zijn de effecten van* [REDACTED] [REDACTED]?

Wij willen enkel onderzoeken dat als duodenum, maag of andere omliggende organen betrokken zijn in het proces en het om die reden onvermijdelijk is die structuren/organen mee te nemen in de behandeling, of dat weefsel door IRE-[REDACTED] irreversibel beschadigd raken. Een voorbeeld is een pancreaskoptumor, die doorgroeit in het duodenum. In dat geval is het onvermijdelijk ook vitaal duodenum mee te nemen in de behandeling om het doorgegroeide pancreasweefsel volledig te kunnen ableren. Onderzocht zal worden of het mogelijk is het pancreasweefsel irreversibel te beschadigen, terwijl het duodenum onbeschadigd blijft dan wel de schade reversibel is. Voor de vervolgvraagstellingen waarbij de effecten van grote vaten worden onderzocht, geldt hetzelfde. De behandeling blijft hetzelfde, waarbij wij kijken naar de effecten van [REDACTED] op de vaten en andersom. Om de situaties te simuleren zal in het eerste geval de vena porta en andere kleinere vaten worden geableerd met IRE-[REDACTED] en in het tweede geval het pancreasweefsel (een van de lobben) om de vena porta worden 'gevouwen', waarna de ablatie plaatsvindt.

2. Kunt u de go no-go momenten beschrijven? Op basis waarvan wordt besloten wat de vervolgexperimenten zijn?

Zoals beschreven staat in het Projectvoorstel onder 3.4.1 en in de eerste zin van de laatste alinea onder A van Bijlage Beschrijving dierproef 1, zal de uitkomst van de veiligheidsstudie bepalend zijn voor de uitvoering van de vervolgvragen. Indien de techniek niet veilig blijkt te zijn dan zullen de vervolgstudies niet worden uitgevoerd. Gezien IRE een levensverlengende behandeling is met vergelijkbare overlevingswinsten als de curatieve behandeling (Whipple/PPPD) van het pancreascarcinoom en de hypothese is dat IR [REDACTED] deze uitkomsten ook oplevert, is een morbiditeit en mortaliteit vergelijkbaar met die van een Whipple/PPPD acceptabel: IRE-[REDACTED] achten wij veilig als de morbiditeit niet hoger is dan 48% en de mortaliteit niet meer is dan 9%. Dit is als zodanig opgenomen onder A van Bijlage Beschrijving dierproeven 1.

3. Maak 'het niet doden van dieren als onderdeel van of na afloop van het experiment' consistent in de documenten.

Wij hebben het aangepast in alle bijgevoegde documenten. Excuses voor de inconsistentie.

Wij hopen hiermee u vragen voldoende te hebben beantwoord. Wij zien uw reactie graag tegemoet.

Alvast dank.

Hartelijke groet,
Mede namens onze onderzoeksgroep,

██████████

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 16 september 2015 22:04
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: dec-utrecht
Onderwerp: Fwd: Aanvraag AVD115002015221

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED] ,

Uw vraag heb ik deze dagen nader besproken met de onderzoekster en met de IvD Utrecht . In gezamenlijk overleg is men tot de conclusie gekomen dat de uitval in type 1 dierproef kan vervallen omdat hetgeen in het verleden is gebeurd zich niet kan herhalen en dus geen structureel probleem is. Dit betekent in dierproef 1 zeven (groepen) X twee is 14 dieren minder . Het totaal aantal van 98 in proef 1 wordt dus 84.

In type 2 dierproef worden stents geplaatst hetgeen soms niet het gewenste resultaat oplevert .Compensatie voor uitval is hier derhalve gerechtvaardigd .

U verwijst terloops naar in de literatuur vermelde afwijkende groeps grootte van 4-6 dieren. Wij weten niet welke literatuur u heeft geraadpleegd maar voor de goede orde zij vermeld dat de onderzoekster overleg heeft gehad met de biostatisticus . Deze kwam tot het advies om 12 dieren per groep in te zetten omdat het een pilot studie betreft . Indien data ontbreken op grond waarvan een power analyse kan worden uitgevoerd is een n is 12 per groep algemeen geaccepteerd . Voorts is de opzet dusdanig dat de dieren hun eigen controle zijn hetgeen dieren spaart .

Dank dat U ons in de gelegenheid stelde nog eens goed naar de extra gevraagde dieren te kijken. Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Verstuurd vanaf mijn iPad

Begin doorgestuurd bericht:

Van: dec-utrecht <dec-utrecht@umcutrecht.nl>
Datum: 15 september 2015 10:16:10 CEST
Aan: [REDACTED]



Secretaris DEC | Raad van Bestuur, Dierexperimentencommissie

Universitair Medisch Centrum Utrecht | Kamernummer C01.106 | Huispostnummer D01.343 | Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT

[REDACTED] | www.umcutrecht.nl | Werkdagen: maandag t/m vrijdag

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 15 september 2015 8:42
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvraag AVD115002015221

Beste DEC,

Uw DEC heeft de CCD geadviseerd over aanvraag AVD115002015221, getiteld: irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten.

Wij hebben hierover nog een vraag betreffende de hoeveelheid reservedieren die de aanvrager zegt nodig te hebben.

De onderzoeker zegt 10% reservedieren nodig te hebben. Op 12 varkens zijn dit dus 2 reservedieren.

De onderbouwing hiervoor vinden wij niet erg helder. Voor zover wij kunnen zien, zijn deze reservedieren alleen nodig om dieren te vervangen die, voorafgaand aan de studie (in de acclimatisatieperiode), het humane eindpunt bereiken (wat volgens de aanvrager gaat om maximaal 1 varken). In dat geval vinden wij 2 reservedieren erg veel, zeker gezien de sample size van 4-6 dieren in vergelijkbare studies uit de literatuur. Wat is de mening van de DEC hierover?

Zou de aanvrager met 1 reservedier per studie af kunnen, of mogelijk zelfs zonder reservedieren? Het gaat immers om pilot studies?

Graag willen wij de mening van de DEC over dit punt. Wij zouden dit graag inbrengen in de aankomende CCD vergadering, daarvoor hebben wij uiterlijk donderdag 17 september uw antwoord op deze vraag nodig. Hopelijk kunt u hiervoor zorgen.

Met vriendelijke groet,

████████████████████

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.

This message may contain confidential information and is intended exclusively for the addressee. If you receive this message unintentionally, please do not use the contents but notify the sender immediately by return e-mail. University Medical Center Utrecht is a legal person by public law and is registered at the Chamber of Commerce for Midden-Nederland under no. 30244197.

Please consider the environment before printing this e-mail.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht
t.a.v. Instantie voor dierenwelzijn
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
AVD115002015221

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 24 september 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten" met aanvraagnummer AVD115002015221. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

De CCD heeft gesproken over uw aanvraag, waarbij uit is gegaan van de informatie die wij van DEC Utrecht hebben ontvangen betreffende het aantal reservedieren. Op 16 september hebben wij van DEC Utrecht een e-mail gekregen waarin zij zeggen met de onderzoeker en de IvD over het aantal reservedieren te hebben gesproken.

De CCD kan accoord gaan met de aanvraag, ervan uitgaande dat het aantal dieren is zoals beschreven in deze laatste e-mail van de DEC (n=84 voor dierproef 1 en n=28 voor dierproef 2).

Welke informatie nog nodig

Graag ontvangen wij van u een aangepaste NTS met hierin het correcte aantal dieren vermeld (n=84 voor dierproef 1 en n=28 voor dierproef 2).

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.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Datum
24 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015221

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
- 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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 12:07
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD115002015221
Bijlagen: NTS 05-10-2015.docx

Beste [REDACTED],

Mijn excuses voor het ongemak. Zoals eerder beantwoord is het ingeschatte ongerief matig. Dat heb ik als zodanig aangepast in het NTS, zie bijgevoegd.

Ik hoop hiermee uw vraag te hebben beantwoord en zien uw vergunning graag tegemoet.

Hartelijke groet,

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 12:01
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD115002015221

Beste [REDACTED]
Bij een laatste controle van de NTS van uw aanvraag AVD115002015221 viel mij op dat het ongerief van de dieren in dierproef 2 in de NTS benoemd is als "terminaal" terwijl u in de aanvraag en de beantwoording van de eerder gestelde vragen heeft aangegeven dat deze dieren aan het eind van de proef in leven worden gehouden. Daarom zou het ongerief van deze dieren als matig moeten worden ingeschat. Bent u het eens met deze ongeriefsinschatting en kunt u op basis daarvan de NTS nog aanpassen?

Omdat ik verzuimd heb deze vraag eerder te stellen, terwijl dit wel eerder was opgemerkt, zal ik wel verder gaan met het aanmaken van de beschikking. Indien mogelijk zou ik wel graag z.s.m. te horen krijgen of u het eens bent met de ongeriefsinschatting, zodat dit correct op de vergunning wordt gezet.

met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.

Denk s.v.p aan het milieu voor u deze e-mail afdrukt.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015221

06 OKT. 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten" met aanvraagnummer AVD115002015221. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 1 september 2015 heeft u uw aanvraag gewijzigd. Op basis van vragen gesteld door het secretariaat heeft u aanvullingen gestuurd en een gewijzigde aanvraag ingediend. Op 11 september 2015, 29 september 2015 en 5 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld/gewijzigd op basis van door het secretariaat gestelde vragen.

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. Hoewel dit buiten de aanvraag valt, wordt geen post-operatieve pijnbestrijding in bijlage 2 beschreven. Ook wordt voor zowel bijlage 1 als bijlage 2 niet beschreven dat/of de dieren extra in de gaten worden gehouden vanwege het verder leven na pancreatectomie. Dit valt buiten de aanvraag, maar het toekomstig gebruik van deze dieren en de termijn waarop deze dieren in leven blijven dient met het IvD te worden besproken.

De overige voorwaarden zijn standaard voorwaarden. U kunt met uw project "Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 oktober 2015 tot en met 31 augustus 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat omdat de aangevraagde begindatum in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 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 stelt de CCD een aantal algemene voorwaarden. Op 16 september 2015 heeft de DEC, op verzoek van het secretariaat, in overleg met de onderzoeker en de IvD, extra geadviseerd over het aantal reservedieren. Hierdoor is het totaal aantal dieren verminderd ten opzichte van de aanvraag. 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 zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

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 plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 oktober 2015 tot en met 31 augustus 2020, voor het project "Irreversibele electroporese van het pancreas: lange en korte termijn uitkomsten" met aanvraagnummer AVD115002015221, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is arts-onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 5 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 augustus 2015, ontvangen op 18 augustus 2015 en aangevuld op 16 september 2015;
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 1, 11 en 29 september 2015, en 5 oktober 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Varkensstudie: veiligheid en effecten van IRE- [REDACTED] in het pancreas	Varkens (Sus scrofa domesticus) / geen voorkeur	84	Matig / moderate	
Varkensstudie: veiligheid en effecten van IRE [REDACTED] in het pancreas met galgangstent.	Varkens (Sus scrofa domesticus) / geen voorkeur	28	Matig / moderate	

Voorwaarden

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

1) Als de dieren uit bijlage 2 geschikt worden bevonden voor hergebruik krijgen deze dieren na pancreatectomie een geschikte post-operatieve pijnbestrijding. Beoordelen van de gezondheidsstatus van de dieren (van bijlage 1 en bijlage 2) en gebruik in vervolgprouven dient met de IvD te worden afgestemd.

2) Go/no go momenten instemming van de IvD verkrijgen.

3) 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 een ontheffing is verleend.

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

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

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

[REDACTED]
mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvoorstel [REDACTED]
- Vergunning [REDACTED]

Hiervan deel uitmakend:

- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving

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
	NTS 20151222								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Beschikking en vergunning				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	DEC-advies				x		x	x	
5	Projectvoorstel				x		x	x	
6	bijlage dierproef 1				x		x	x	
7	bijlage dierproef 2				x		x	x	
8	bijlage bij aanvraag				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x		
10	CCD advies		x						x

21 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 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 11800

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	Academic Medical Center Amsterdam								
Naam van de portefeuliehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]								
KvK-nummer	3	4	3	3	6	2	7	7	7
Straat en huisnummer	Melbergdreef							31	
Postbus									
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam							
IBAN	NL68RABO0136166741								

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

Tenaamstelling van het rekeningnummer Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[REDACTED]	
Afdeling	[REDACTED]	
Telefoonnummer	[REDACTED]	
E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.

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

Telefoonnummer	
E-mailadres	

4 Betaalgegevens

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

<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741	Lege
<input type="checkbox"/> Wijziging €	Lege
<input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso	
<input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input checked="" type="checkbox"/> Bijlage 1 (Figuren) en Appendix 3.4.4.1 en 3.4.4.2

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	
FUNCTIE	
Plaats	Amsterdam
Datum	1 8 - 0 8 - 2 0 1 5
Handtekening	

Procedure van betaling AMC

Factuur sturen aan:

AMC crediteurenadministratie

Postbus 400

1115 ZJ Duivendrecht

Onder vermelding van:

Kostenplaatsnummer 7510



**Gegevens ten behoeve voor het beoordelen van de
projectvergunningaanvraag door de Centrale Commissie Dierproeven**

Naam instelling	ACADEMISCH MEDISCH CENTRUM
Afkorting instelling	AMC
Deelnemer nummer NWWA	11800
Titel en naam contactpersoon	[REDACTED]
Toevoegingen (Kamernr.)	[REDACTED]
Correspondentie adres	MEIBERGDREEP 31
Correspondentie postcode	1105 AZ
Correspondentie woonplaats	AMSTERDAM
Bezoekadres	IDEM
Postcode	106M



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum Amsterdam
t.a.v. [REDACTED]
Meibergdreef 31
1105 AZ Amsterdam

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
AVD118002015222
Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 24 september 2015
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven
Geachte heer/mevrouw,

Op 18 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project [REDACTED] met aanvraagnummer AVD118002015222. 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 'Protease-activated receptor 1 in pancreatic cancer' starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 30 augustus 2020.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 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. 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.

Datum
24 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002015222


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

Meer informatie

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

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: Academisch Medisch Centrum Amsterdam

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en woonplaats: 1105 AZ Amsterdam

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 30 augustus 2020, voor het project [REDACTED] met aanvraagnummer AVD118002015222,

volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-AMC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende beschelden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 18 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 18 augustus 2015 en aangepaste Niet-technische Samenvatting, zoals ontvangen bij digitale indiening op 23 september 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 18 augustus 2015

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Orthotopic pancreatic cancer model	Muizen	1300	Matig
Subcutaneous pancreatic cancer model	Muizen	180	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 voor aanvang van het project worden vastgesteld en dat de IVD instemt met de vastgestelde criteria.

-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

Datum
24 september 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002015222

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.



Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: [REDACTED]
2. Titel van het project: [REDACTED]
3. Titel van de NTS: Betere chemotherapie bij alveeskliekeranker
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC: naam DEC: DEC-AMC
 - telefoonnummer contactpersoon: 020-5666479
 - mailadres contactpersoon: dec@amc.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 04-06-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD 13-08-2015
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
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Datum antwoord
 - Strekking van het (de) antwoord(en)
 - 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 (dierproeven in de zin der wet)
Ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
Ja
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering
Nee

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is/zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)
> Het doel is basaal wetenschappelijk en translationeel onderzoek, als in de wet genoemd.

3. Is het project in overeenstemming met geldende wet en regelgeving?

> Ja

4. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een deels essentieel, deels substantieel belang.

> meningen van DEC-leden variëren tussen substantieel en essentieel; het belang van de hoofddoelstelling voor zover deze het ophelderen van de vermoedelijke mechanismen betreft waarmee [redacted] drug resistentie veroorzaakt, wordt ingeschat als essentieel. Het belang van de doelstelling om het mogelijk belang van [redacted] in (de behandeling van) pancreaskanker vast te stellen (of kortweg: om te komen tot een betere behandeling van pancreaskanker) wordt als substantieel ingeschat, vanwege de relatief grote afstand die nog bestaat tussen dit fundamentele onderzoek en toepassing van de resultaten ervan in de kliniek.

Een opmerking van de DEC-AMC naar aanleiding van deze vraag: de vier gradaties van de mate van belang die in de vraagstelling worden genoemd, zijn in het geheel niet nader omschreven. Het wordt kennelijk geheel aan het persoonlijk gevoel van de individuele DEC-leden en aan de discussie in de vergadering overgelaten om betekenis aan deze termen toe te kennen. Dit wordt onwenselijk geacht. Een handreiking van de CCD hierbij, met enkele voorbeelden, zou de discussies hierover in de vergadering kunnen bekorten, en ook bijdragen aan nationale harmonisatie.

5. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

> Omdat het *uiteindelijke* doel nogal ver weg wordt gelegd, waarbij de onderzoeker ervan uitgaat dat de mechanismen die hij mogelijk in een bepaalde muizenstam zal kunnen onttrafelen, ook in de mens aanwezig zullen zijn, is de kans dat dit uiteindelijke doel reeds bij afronding van dit project zal zijn bereikt, niet groot. De drie vraagstellingen (of "directe doelen") die onderwerp zijn van studie binnen dit project, zullen hoogstwaarschijnlijk met de voorgestelde strategie en experimentele aanpak kunnen worden beantwoord (behaald).

6. Zijn kennis en kunde van onderzoekers en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd?

> Ja, de onderzoeker heeft ervaring met het model en met de beschreven handelingen bij muizen. De aanvrager en medewerkers hebben ervaring met het model.

7. Wat is het effect van onderzoek op het welzijn van mens, dier en omgeving en wetenschappelijke kennis?

> Mogelijkheid voor het vinden van een effectievere behandeling van pancreaskanker, door het bestrijden van drug resistentie, en kennisvermeerdering in fundamentele mechanismen die mogelijk ook bij andere resistente tumoren de behandeling verstoren. Deze studies hebben geen negatief effect op het welzijn van de mens of van het dier, of de omgeving.

8. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categoriën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

- > Geen bijzonderheden

9. De kwaliteit van de huisvesting en verzorging is wel/niet volgens bijlage III van de richtlijn en wordt geborgd door....

- > Voldoet aan bijlage III; geborgd door de IVD

10. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

- > Het ongerief wordt ook door de DEC ingeschat als matig. Bij een zeer gering aantal dieren (<5%) zou korte tijd ernstig ongerief kunnen ontstaan ten gevolge van complicaties, maar door toepassing van scherp gedefinieerde humane eindpunten zal dit tot een minimum beperkt blijven.

11. De onderzoekers hebben de volgende alternatieven voorgesteld. Deze kunnen de voorgestelde dierproeven wel/niet geheel/gedeeltelijk vervangen

- > Binnen het project worden in vitro en ex vivo experimenten gedaan, maar deze kunnen niet expliciet als "alternatief" worden aangemerkt, omdat ze nu eenmaal de best geëigende methode vormen voor het beantwoorden van de desbetreffende vraagstellingen. Zij komen niet in de plaats van dierproeven.

12. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan het vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

- > Het maximum aantal dieren dat binnen dit project zal worden gebruikt, moet hier worden aangegeven, en het spreekt vanzelf dat het opgegeven aantal enige onderbouwing behoeft. Aantallen dieren per groep, aantal groepen per soort experiment, aantal experimenten en eventuele herhalingen per specifieke vraagstelling, verwachte uitval, etc. kunnen allemaal van tevoren worden ingeschat, om tot een inschatting van het totaal aantal benodigde dieren te komen. De onderzoeker heeft dat alles naar behoren en zorgvuldig gedaan, en geeft ook aan dat voortdurend zal worden bekeken aan de hand van de feitelijke spreiding binnen reeds uitgevoerde experimenten, of voor volgende experimenten de groeps-grootte niet naar beneden kan worden bijgesteld. Voor te verwachten uitval (<5%) is geen compensatoir aantal dieren opgenomen in de schatting van het totale gebruik.

Een pva dient ook voldoende informatie te bevatten over de methodologische en statistische aanpak, die door de DEC zal worden betrokken in haar beoordeling en afweging. Vermindering van het aantal te gebruiken dieren door gebruik van de juiste methoden en technieken kan hier slechts globaal worden ingeschat. De door de onderzoeker te volgen strategie, zoals de volgorde waarin

onderdelen van het project worden uitgevoerd (waarbij verkregen resultaten van het ene experiment de invulling van het volgende kunnen bepalen), kan een verdere significante invloed hebben op het totaal aantal te gebruiken dieren. Hoewel deze volgorde niet tot in detail is uitgewerkt, zijn er voldoende aanwijzingen dat de onderzoeker zich hiervan bewust is, en waar mogelijk, de meest dierbesparende strategie zal volgen.

Wanneer de werkprotocollen behorende bij de afzonderlijke dierproeven bij de IVD zullen worden ingediend zal de onderzoeker veel nauwkeuriger kunnen aangeven welke mogelijkheden voor vermindering er zijn, en welke maatregelen hij zal nemen om het aantal te gebruiken dieren zoveel mogelijk te verminderen. In dat stadium zal het werkprotocol ook ter toetsing aan een statisticus worden voorgelegd.

13. 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 geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

> Uit de elementen genoemd in de beschrijving van de dierproeven onder D kan worden afgeleid dat de onderzoeker goed op de hoogte is van regelgeving, richtlijnen, en onder deskundigen heersende meningen met betrekking tot welzijnsaspecten, en dat alles is gedaan om de proeven zoveel mogelijk te verfijnen.

In dit stadium, en op het abstracte niveau van een pva, zijn moeilijk alle details van middelen en maatregelen van verfijning aan te geven. In de werkprotocollen kunnen per experiment de specifieke verfijningsmaatregelen worden aangegeven die zullen worden gebruikt. De IVD heeft de expertise om dit op detailniveau te beoordelen, en zal ook toezien op de feitelijke uitvoering ervan.

14. Worden de belangen van consumenten, burgers, dieren en omgeving voldoende beschermd?

> Ja, door de experimenten uit te voeren onder DM2 regime wordt de omgeving voldoende beschermd. De belangen van consumenten, burgers en dieren (in de natuur of aan de zorg van mensen toevertrouwd, niet de proefdieren in dit experiment worden hier bedoeld) komen door dit experiment in het geheel niet in gevaar, en hoeven dus niet te worden beschermd.

15. Worden dieren in voorraad gedood in het kader van het project of na afloop van het project? Kan dit voorkomen worden?

> Ja, door de experimenten uit te voeren onder DM2 regime wordt de omgeving voldoende beschermd. De belangen van consumenten, burgers en dieren (in de natuur of aan de zorg van mensen toevertrouwd, niet de proefdieren in dit experiment worden hier bedoeld) komen door dit experiment in het geheel niet in gevaar, en hoeven dus niet te worden beschermd.

D. Ethische afweging

De DEC acht het wetenschappelijk belang van deze studie groot: het onderzoek leidt zeer waarschijnlijk tot het ophelderen van de mechanismen waarmee PAR1-afhankelijke drugresistentie wordt veroorzaakt. Dit inzicht in de PAR1-afhankelijke drugresistentie zal mogelijk bij kunnen dragen aan een effectievere behandeling van pancreaskanker. Dit maatschappelijk belang weegt de DEC mee, ook al is de weg naar de behandelkamer nog lang.

De DEC is van mening dat in deze studie tegemoet wordt gekomen aan de 3 V's:

- Deze studie wordt deels uitgevoerd met in-vitro en ex-vivo experimenten. Deze kunnen echter niet volledig de dierproeven *vervangen*.
- Het aantal te gebruiken proefdieren is door gebruik te maken van de juiste methoden en technieken door de onderzoeker ingeschat op 1500. De DEC acht deze globale inschatting voor de gehele studie als zorgvuldig. De onderzoeker geeft tevens aan dat er tijdens het onderzoek zal worden bekeken of de groepsgrootte naar beneden kan worden bijgesteld. De onderzoeker zal hierin samenwerken met een statisticus en de IVD. Hiermee wordt tegemoet gekomen aan de eis van *vermindering*.
- Uit de elementen genoemd in de beschrijving van de dierproeven leidt de DEC af dat de onderzoeker goed op de hoogte is van regelgeving, richtlijnen, en onder deskundigen heersende meningen met betrekking tot welzijnsaspecten. De DEC erkent de *verfijnings*methoden van de onderzoeker om het leed bij de proefdieren zo veel mogelijk te beperken.
- De DEC schat het ongerief van de muizen in als matig. Er is een kleine kans op ernstig ongerief door complicaties, die tot een minimum beperkt zal worden door toepassing van de geformuleerde humane eindpunten.

In de afweging van de DEC is meegenomen dat pancreaskanker alleen al in Nederland jaarlijks bij 2200 mensen wordt vastgesteld, waarbij de kans om 5 jaar na diagnose nog in leven te zijn 5% is.

Deze studie geeft inzichten over de PAR1-afhankelijke drugresistentie (wetenschappelijk belang) en zal door die inzichten op termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling van pancreaskanker bij mensen (maatschappelijk belang). Door deze voordelen voor de wetenschap en de mogelijke verbeteringen voor het welzijn van de mens vindt de DEC het voorgestelde gebruik van de proefdieren en de wijze waarop zij in hun welzijn worden aangetast te rechtvaardigen.

E. Advies

1. De DEC adviseert de vergunning te verlenen
2. Dit advies is gebaseerd op een unaniem standpunt van de DEC. Nadat was vastgesteld dat er aan de voorwaarden is voldaan van deugdelijk wetenschappelijk onderzoek en er rekening is gehouden met de 3 V's zijn in de afweging de volgende factoren van doorslaggevend belang geweest: het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek versus de mate van ongerief bij de proefdieren.
Deze studie geeft inzichten over de PAR1-afhankelijke drugresistentie (wetenschappelijk belang). Die inzichten kunnen op termijn mogelijk een bijdrage leveren aan een betere behandeling van pancreaskanker bij mensen (maatschappelijk belang). De DEC vindt het te rechtvaardigen dat voor deze voordelen voor de wetenschap en de mogelijke verbeteringen voor het welzijn van pancreaskankerpatiënten 1500 muizen worden gebruikt en in hun welzijn worden aangetast (matig ongerief).



Form

Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Pancreatic cancer is a **devastating disease** with the worst survival outcome of any human cancer. The incidence, which is around 10 per 100,000 individuals, is rising in developed countries, with around 44 thousand new cases and 37 thousand deaths in the United States in 2011. The overall 5-year survival rate is less than 5%, and overall mortality approaches 99%. Only in around 20% of patients, surgical resection is a possible, which is associated with improved 5-year survival rates of 15–20%. However, the vast majority of this limited group of eligible patients eventually die because of metastatic disease.

Progress in improving survival of pancreatic cancer patients has been slow, and current treatment options are severely inadequate. The only significant progress has been a slight prolongation and improved quality of life in patients with unresectable disease by chemotherapeutic agents. In the Netherlands, gemcitabine is first-line standard of care for inoperable pancreatic cancer although the observed benefits are small and seem restricted to patients with a relatively good health. Recent combination therapies with different chemotherapeutic agents, like FOLFIRINOX or gemcitabine/nab-paclitaxel, seem to be superior over single-drug regimens but even in the specific group of patients eligible for this treatment, the survival benefit is limited. To increase survival of pancreatic cancer patients, it is pivotal to understand why chemotherapy is so ineffective in pancreatic cancer and to identify novel targets to improve the effectivity of chemotherapy.

is suggested to be expressed on cancer cells (both human and mouse) and to induce their proliferation. Interestingly however, is mainly expressed on cells surrounding the actual tumor cells in pancreatic cancer patients (This may be particularly important as the compartment is one of the most characteristic hallmarks of pancreatic cancer that is actively involved in tumor growth and drug resistance. Indeed, pancreatic cancer cells release various factors that stimulate cells (mainly fibroblasts, macrophages and endothelial cells). cells, in turn, release mitogenic substances that stimulate tumor growth, invasion, and resistance to therapy.

To assess the potential relevance of expression in the compartment of pancreatic cancers, we recently analysed the efficacy of chemotherapy on the growth of wild type pancreatic cancer cells in wild type . Intriguingly, dramatically potentiated the efficacy of chemotherapy in this murine pancreatic cancer model (). All chemotherapy treated wild type mice showed large tumors at sacrifice, whereas no tumors were observed in % of gemcitabine treated mice. In the remaining tumor size was reduced about 25-fold as compared to wild type mice treated with gemcitabine. Our data thus identify expression in the as a key component in drug resistance of pancreatic cancer. The underlying mechanism by which modifies drug resistance of pancreatic cancer remain elusive however and in the current project we aim to elucidate the mechanism using different in vitro, ex vivo and murine models.

3.2 Purpose

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

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

The overall aim of the current project is to elucidate the mechanism by which ██████ modifies drug resistance and to determine the potential relevance of ██████ in pancreatic cancer. To this end, we aim to address three objectives:

1. Determining whether macrophages are the ██████ responsible for ██████ (drug resistance in) pancreatic cancer – Macrophages were long thought to “attack” tumor cells and thus to diminish tumor growth and to induce drug sensitivity. More recent data show however that tumour-associated macrophages are important drivers of pancreatic cancer progression and drug resistance (Tang, et al. Immunology 138:93-104, 2013). Consequently, we hypothesize that macrophages are the ██████ cells that drive ██████ drug resistance. In line with this hypothesis, we recently showed that 1) macrophage numbers are reduced in ██████ pancreatic ██████, 2) ██████ potentiates macrophage migration towards tumor cells in vitro and 3) ██████. In the current project, we aim to prove or refute the importance of macrophages in ██████ drug resistance in an *in vivo* setting.

2. Elucidation of the ██████ in the setting of pancreatic cancer – ██████, etc). The fact that ██████ inhibition only marginally improves overall survival of pancreatic cancer patients suggest that ██████ is not the ██████ in the setting of pancreatic cancer. In line with this notion, we recently showed that ██████ ion did not mimic ██████ in the ██████ pancreatic cancer model (██████). Consequently, we aim to identify (and characterise) the ██████ in pancreatic cancer subsequently leading to drug resistance in the ██████ pancreatic cancer model.

3. Establishing whether ██████ (drug resistance in) pancreatic cancer is a general mechanism – The experiments leading up to this proposal showed that genetic ablation of ██████ from the host compartment (██████) pancreatic cancer metastasis and potentiated gemcitabine sensitivity. Importantly however, these experiments have been performed using a single ██████ pancreatic cancer model in combination with a single chemotherapeutic drug. As a first step towards assessing the potential clinical relevance of ██████ inhibition in pancreatic cancer, it is however pivotal to validate our findings in alternative pancreatic cancer models using alternative chemotherapeutic drugs.

3.3 Relevance

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

Overall, the project will significantly contribute to the understanding of underlying mechanisms leading to drug resistance in pancreatic cancer. In detail:

Ad objective 1 - We will obtain mechanistic insight whether macrophages present in the pancreatic cancer ██████ affect chemotherapy response in pancreatic cancer. In addition to its scientific importance (identifying a key cell type in drug resistance), it may guide future experiments aiming at a full understanding of drug resistance in cancer which may ultimately benefit patients.

Ad objective 2 - We will identify the ██████ driving chemotherapy resistance in the ██████ pancreatic cancer model. The

identification of this [REDACTED] protease may be very relevant as it allows the specific targeting of the "[REDACTED]" pancreatic cancer pathway without targeting all [REDACTED]. Such a treatment strategy would obviously be more safe as compared to strategies targeting [REDACTED]. This latter point is emphasized by the fact that [REDACTED] lead to [REDACTED] due to the inhibition of [REDACTED] signalling on [REDACTED]. Targeting the e [REDACTED] [REDACTED] protease relevant for pancreatic cancer will however not induce [REDACTED] [REDACTED] is not affected.

Ad objective 3 - We will establish whether targeting [REDACTED] affects drug resistance in a more general fashion. Determining whether [REDACTED] also induces drug resistance in alternative models, using alternative chemotherapeutics that are used in the clinics, should identify [REDACTED] as a general modifier of drug resistance in pancreatic cancer. If so, [REDACTED] ([REDACTED] inhibitors may be considered for clinical research.

3.4 Research strategy

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

We opt for an approach combining ex vivo experiments using monocytes and tumor-associated macrophages with murine models for tumor growth and drug resistance, as well as human pancreatic cancer material. In detail:

Ad 1: Determining whether macrophages are the [REDACTED] cells responsible for [REDACTED] (drug resistance in) pancreatic cancer - Preliminary *in vitro* experiments suggest that macrophages could be the responsible cells for [REDACTED] drug resistance. [REDACTED], [REDACTED] drives macrophage migration both *in vivo* and *in vitro* and macrophages limit gemcitabine efficacy *in vitro* ([REDACTED]). The real importance of macrophages in [REDACTED] drug resistance needs to be proved or refuted *in vivo* however. Consequently, gemcitabine efficacy will be analyzed in [REDACTED] pancreatic tumors growing in macrophage depleted (wild type or [REDACTED] mice and in bone marrow transplanted (wild type bone marrow to [REDACTED] and vice versa) mice. If macrophages are indeed the cells responsible for [REDACTED] dependent drug resistance, we will next perform *ex vivo* experiments to elucidate the mechanism. In these latter experiments, tumor-associated macrophages isolated from wild type or [REDACTED] will be co-cultured with tumor cell lines (*in vitro*).

Ad 2: Elucidation of the endogenous [REDACTED] [REDACTED] in the setting of pancreatic cancer - Ten different [REDACTED] [REDACTED] have been described in different model systems but the [REDACTED] in the setting of pancreatic cancer remains elusive. Consequently, we aim to identify the [REDACTED] driving (drug resistance of) pancreatic cancer. To this end, a hypothesis driven approach in which the expression of all currently known [REDACTED] [REDACTED] is assessed in pancreatic cancer biopsies is combined with unbiased (i.e. without a priori hypotheses) approaches using [REDACTED]. The unbiased approach is included as novel [REDACTED] capable of activating [REDACTED] are still being identified, and it may well be that [REDACTED] in pancreatic cancer is activated by a [REDACTED] not yet known to activate [REDACTED]. The relevance of the identified [REDACTED] [REDACTED] is validated in the pancreatic cancer model(s) either using pharmacological inhibitors or using knock-out mice.

Ad 3: Establishing whether [REDACTED] (drug resistance in) pancreatic cancer is a general mechanism - The experiments leading up to this proposal have been performed using a single ([REDACTED] pancreatic cancer model in combination with a single chemotherapeutic drug. It is thus pivotal to validate our findings in alternative pancreatic cancer models using different chemotherapeutic agents to assess the general nature of our finding that [REDACTED] drives drug resistance in pancreatic cancer. In case [REDACTED] also drives drug resistance in alternative models, targeting [REDACTED] in the clinical setting may be pursued. In case [REDACTED] induces resistance in specific models, future experiments should identify the characteristic differences between the models responsible for the differential effects, and targeting [REDACTED] in the clinical setting should in that case not (yet) be pursued.

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.

In all three different parts of the project, we will employ [REDACTED] pancreatic cancer models. In these models, murine pancreatic cancer cells are injected into the pancreas of wild type or genetically modified mice for [REDACTED] tumors to develop (for details, see appendix "animal procedures 3.4.4.1"). We opt for [REDACTED] models using murine pancreatic cancer cells, considering the importance of the immune system in pancreatic cancer development and drug resistance. In most experiments, we will inject [REDACTED] pancreatic cancer cells, as these cells are most frequently used in literature to induce [REDACTED] pancreatic tumors and as these cells were used in the preliminary experiments that form the basis of this application. In these experiments we observed that [REDACTED] tumors grew slower in gemcitabine-treated [REDACTED] deficient mice as compared to gemcitabine-treated wild type mice. To allow proper mechanistic studies, the experiments proposed in objectives 1 and 2 need to be performed using the same model. To address objective 3, we will compare the [REDACTED] model with an [REDACTED] model using an alternative murine pancreatic cancer cell line and with combination with a subcutaneous model. In detail:

Ad 1: Macrophages in drug resistance – To prove or refute the key role of macrophages in drug resistance of pancreatic cancer, we will [REDACTED] [REDACTED] and we will exchange macrophages between wild type and [REDACTED] [REDACTED] by [REDACTED]. Subsequently, [REDACTED] tumor growth is assessed as indicated in appendix "animal procedures 3.4.4.1".

Clodronate - The systemic injection of liposome-encapsulated clodronate in mice rapidly depletes peripheral monocytes (90% within 24 hours) as well as resident tissue macrophages, although with a lower efficacy. Moreover, clodronate treatment selectively induces apoptotic cell death in monocytes and macrophages without affecting lymphocytes and neutrophils and, unlike other methods of macrophage depletion, clodronate treatment does not result in secretion of pro-inflammatory cytokines. Macrophage depleted (or not, in the control situation) wild type and [REDACTED] will be subjected to the [REDACTED] [REDACTED] pancreatic cancer model. After tumor cell injections, mice are randomized and subjected to gemcitabine or solvent control treatment. In subsequent experiments, we may deplete monocytes/macrophages later after tumor cell injections to assess the time frame in which [REDACTED] exerts its effects.

Bone marrow transplantation - In these experiments, wild type bone marrow is transplanted into irradiated wild type and knock-out mice whereas knock-out bone marrow is transplanted into irradiated knock-out mice or wild type mice (the mice receiving bone marrow of their own genotype, like for instance wild type to wild type, serve as controls in subsequent experiments). One week after tumor cell injections into the pancreas, mice are randomized for gemcitabine or solvent control treatment.

If the in vivo experiments show that macrophages are indeed essential for [REDACTED] dependent drug resistance, subsequent mechanistic *ex vivo* experiments will be performed using tumor-associated macrophages isolated from wild type and/or [REDACTED] mice. To this end, excised tumors are minced, treated with collagenase, and macrophages are isolated by FACS sorting. The isolated macrophages are used in co-cultures with (different) pancreatic cancer cell lines to assess their effect on chemotherapy (gemcitabine, nab-paclitaxel and FOLFIRINOX)-induced cytotoxicity. To determine whether direct cell-contacts are essential in macrophage-induced drug resistance, similar experiments using growth medium obtained from the different macrophages instead of the macrophages themselves will be performed.

ad 2: Endogenous [REDACTED] agonist - We will determine which of the known [REDACTED] a [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] is present/expressed (on mRNA and protein level) in [REDACTED] grown [REDACTED] pancreatic tumors and healthy control pancreas. Expression levels will be determined at different time intervals after cancer cell injection to assess "the time of onset" of [REDACTED] [REDACTED] expression. All proteases that are present either in plasma or tumors are potential [REDACTED] and these [REDACTED] will be studied in vitro for their effect on tumor growth and drug resistance. Moreover, levels of these [REDACTED] [REDACTED] will be analysed in patient biopsies to correlate expression levels with disease progression and drug response.

In addition to the hypothesis driven approach, we will also perform an unbiased (hypothesis free) approach which would allow the identification of novel (not

yet described) ██████████ ██████████ in the setting of pancreatic cancer. To this end, ██████████ grown pancreatic tumors (and control non tumor containing pancreas) are homogenised and subjected ██████████ ██████████. As obviously not all ██████████ present in pancreatic cancers are able to ██████████ we will next analyse the capacity of the identified ██████████ using an in vitro model system.

ad 3: General nature of ██████████ drug resistance – We will assess the effect of ██████████ on the efficacy of alternative chemotherapeutic agents using the ██████████ model. We will compare gemcitabine with nab-paclitaxel (drug used in some patients shown to target both tumor cells and the ██████████ compartment) and with FOLFIRINOX (drug combination shown to be effective in a small group of patients). We opt for these three different chemotherapeutic agents as these three drugs –with a different mode of action- are used in the clinics.

In addition, we will determine whether ██████████ also drives gemcitabine resistance of an ██████████ model using KP pancreatic cancer cells. These tumor cells (derived from pancreatic adenocarcinomas from p48-CRE/LSL-KRAS/P53flox/flox mice) harbour different mutations as the ██████████ cells and are thus perfectly suited to determine whether ██████████ drug resistance is dependent on the genetic status of the tumor cells. Depending on the results with the different chemotherapeutic agents in the ██████████ model, we may analyse the effect of either nab-paclitaxel or FOLFIRINOX in the “KP” ██████████ model. If ██████████ also modifies drug resistance in the KP model, and if macrophages play a key role in ██████████ ██████████ resistance in the Panco2 model (objective 3.1), we may perform either clodronate depletion or bone marrow transplantation (the most effective strategy in objective 3.1) experiments in the KP model to assess whether macrophages also drive resistance in the KP model.

██████████ tumor models are generally preferred over subcutaneous models because ██████████ models are more similar to clinical tumors due to the establishment of a heterogeneous tumor microenvironment, the expression of biologically relevant growth factor receptors and proteins, and the metastatic potential of tumor cells to spread to distant sites, thereby reflecting the natural course of clinical cancers (Fung, BMC Cancer 15, 112, 2015). One could however argue that handling of the pancreas during tumor cell injection may lead to pancreatitis. To rule out that that the effects observed in the ██████████ model is due to ██████████ pancreatitis, we will analyse the effect of gemcitabine in a subcutaneous ██████████ model.

If the results of Objective 1 (see section 3.2) show that ██████████ expression on macrophages determines drug resistance, we will perform bone marrow transplantation experiments in which ██████████ (or wild type control) BM is transplanted into irradiated KPC mice (mice harbouring three mutations leading to spontaneous pancreatic cancer development). Mice between 6-8 weeks of age, when on average the first signs of pancreatic cancer arise, will be used in the BM experiments. After engraftment, mice are randomized for saline or chemotherapy treatment.

One of the most interesting results of our preliminary experiments is that in ██████████% of gemcitabine treated ██████████ ██████████ no tumor could be observed at sacrifice whereas in the other ██████████ mice only very small necrotic tumors were found. To assess whether indeed no residual tumor cells are present in gemcitabine treated ██████████ animals and thus whether tumors are completely regressed or only delayed, we will sacrifice mice at different time intervals after ending chemotherapy. In addition, we will initiate chemotherapy later after tumor cell injection to determine whether the treatment effect is also potentiated by ██████████ during later stages of pancreatic cancer growth.

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 experiments should result in a better understanding of the role of ██████████ in pancreatic cancer in general and that of macrophage specific ██████████ in resistance to chemotherapy in particular. The three individual aims (i.e. objectives, see section 3.2) address independent research questions that are not directly dependent on each other for successful completion. Importantly however, results of the individual parts (objectives) will guide experiments in the other parts/objectives (for instance, the ██████████ identified for objective 2 will be targeted in the most relevant model identified in objective 3). All experiments together will ultimately lead to a comprehensive understanding of ██████████ in pancreatic cancer.

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	██████ pancreatic cancer model
2	Subcutaneous pancreatic cancer model
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------|
| 1 | pancreatic cancer model |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Pancreatic cancer cells are injected into the pancreas for [redacted] tumors to develop/grow. At different time intervals after cancer cell injection, mice are killed to excise primary tumors after which both size and weight are determined. Lymph nodes and distant organs (spleen, liver, lung, intestine) are

harvested for both macroscopic and microscopic analysis of metastases. Both primary tumors and metastases will be (immuno)histologically analysed for tumor cell proliferation markers, fibroblast numbers/differentiation status, extracellular matrix production, (lymph)angiogenesis, monocyte/macrophage numbers and/or macrophage differentiation.

In certain experiments, mice will be killed at different time intervals after tumor cell inoculation in order to isolate tumor-associated macrophages and/or tumor-associated fibroblasts which will be used ex vivo. To this end, tumors are excised and subjected to specific purification protocols for either macrophages or fibroblasts.

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

After anaesthesia and pain killing, pancreatic cancer cells (either alone or mixed with fibroblasts) will be injected into the pancreas via a small incision on the abdominal region of the animal. Mice may be treated with either chemotherapy, potential () inhibitors of tumor growth or clodronate liposomes. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after tumor cell inoculation (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001). At the end of the experiment, mice will be sacrificed by cervical dislocation after anaesthesia. During the experiment, mice will be weighed once or twice a week.

In specific experiments aimed to study the importance of immune cell infiltrates into the tumor, bone marrow transplanted mice will be subjected to the pancreatic cancer model. To this end, donor mice (wild type and knock-out) are sacrificed under anaesthesia after which their tibias and femurs are collected to isolate bone marrow cells. Bone marrow collected from 1 donor mouse is used to transplant into 4 recipients.

Two weeks before transplantation, recipient mice are changed to drinking water with antibiotics. At the day of transplantation, recipient mice receive a total body irradiation after which donor-derived bone marrow cells are injected into the tail vein of the recipients. Several weeks after bone marrow transplantation, engraftment of donor cells is determined and mice with proper engraftment of donor bone marrow are used in pancreatic cancer models. At this time point, the drinking water will be changed back to normal water.

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

Most importantly, power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. We will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes in subsequent experiments based on the most recent data. Furthermore, we will combine as much experiments as technically possible to reduce the number of control groups used. Finally, obtained results will guide subsequent experiments (like for instance, only drugs that efficiently limit tumor progression in the model will be used in the alternative KP model).

To determine the expected number of mice to be used in the current project, we envision standard experiments to consist of four to maximal six groups (six groups is the maximal number that can be included on a single day) of mice. 1. Wild type mice, untreated; 2. wild type mice, treatment 1; 3. wild type mice, treatment 2 (either different compound, or different concentration of the compound as treatment 1); 4. deficient mice (either or deficient), untreated; 5. deficient mice (either or treatment 1 and 6. wild type mice, treatment 2 (either different compound, or different concentration of the compound as treatment 1). Based on the most recent experiments employing the model, power calculations suggest we need 10 mice per group, and a standard experiment thus contains 40-60 mice. Moreover, we expect to perform the following experiments in the five year project:

Experiments for Purpose 1:

1.1. Gemcitabine effect after macrophage depletion in model using pancreatic cancer cells.

1.2. Gemcitabine effect after bone marrow transplantation in model using pancreatic cancer cells.

1.3 Gemcitabine effect after macrophage deletion of deficient mice transplanted with wild type bone marrow in model using

pancreatic cancer cells.

1.4. Gemcitabine effect after delayed macrophage depletion in [REDACTED] model using [REDACTED] pancreatic cancer cells (i.e. depletion starting after tumor cell inoculation).

1.5. Ex vivo experiments using using tumor-associated macrophages isolated from wild type and [REDACTED] mice.

Experiments 1.1 and 1.2 are key experiments (to prove or refute the importance of macrophages in [REDACTED] [REDACTED] resistance) that supplement each other and both these experiments will be performed independent of the results of the other experiment. If both the macrophage depletion (1.1) and bone marrow transplantation (1.2) experiments suggest macrophages indeed drive [REDACTED] [REDACTED] drug resistance, we may also deplete macrophages in [REDACTED] deficient mice transplanted with wild type bone marrow (1.3). Obviously, the delayed macrophage depletion experiment (1.4) will only be performed when experiment 1.1 shows a role of macrophages in [REDACTED] [REDACTED] resistance. The ex vivo experiments (1.5) will only be performed when experiments 1.1 and/or 1.2 shows a role of macrophages in [REDACTED] [REDACTED] drug resistance.

Experiments for Purpose 2:

2.1. [REDACTED], immunohistochemical and purification experiments using plasma, pancreas and/or pancreatic tumors from wild type and [REDACTED] deficient mice.

2.2. Validation potential [REDACTED] identified in 2.1 in the [REDACTED] model using [REDACTED] pancreatic cancer cells.

It is difficult to predict the number of [REDACTED] [REDACTED] that will be expressed/identified in pancreatic cancer in 2.1. We will however limit the validation experiments to a maximum of four different [REDACTED] which will be selected based on (differential) expression levels between tumor and healthy pancreas and on the availability of pharmacological inhibitors or deficient mice. In case pharmacological inhibitors have not been tested before in mice, we will either test 2 different concentrations or we will first perform dose-finding experiments.

Experiments for Purpose 3:

3.1. Different chemotherapeutic agents in the [REDACTED] model using [REDACTED] pancreatic cancer cells.

3.2. Most efficient chemotherapeutic agents (obtained in 3.1) in the [REDACTED] model using KP pancreatic cancer cells.

3.3. Most efficient macrophage depletion protocol (obtained in 1.2 and 1.3) in the [REDACTED] model using KP pancreatic cancer cells.

3.4. Most effective [REDACTED] [REDACTED] inhibitors (or knock out mouse, identified in 2.2) in in the [REDACTED] model using KP pancreatic cancer cells.

As indicated, the exact nature of experiments 3.2, 3.3 and 3.4 is based on the results of other parts of the project. Importantly however, we will only analyse cell types, drugs, or [REDACTED] in the KP model that have shown positive results in the [REDACTED] model.

Considering that a standard experiment consist of 60 mice, and the number of experiments indicated above, we will use a number of mice around 850-950 in the actual in vivo experiments. In addition, we need donor mice for the bone marrow experiments, and we need mice for the ex vivo experiments (around 100-150 mice in total). Moreover, we need to repeat key experiments to allow publication in high impact journals that require data of independent experiments (1 key experiment per Purpose; around 200-250 mice). Overall, we thus expect to use around 1200-1300 mice in total.

B. The animals

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good [REDACTED] model in mice).

- Wild type and genetically modified [REDACTED] knock outs for [REDACTED] mice.
- Mice between 7 and 12 weeks of age. In case of using bone marrow transplanted mice, the age may increase to 16 weeks).
- Knock out mice are bred in the Animal facility of the Academic Medical Center Amsterdam, whereas age and sex matched wild type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan. The wild type mice are housed at least 1-2 weeks in the Animal facility of the Academic Medical Center Amsterdam before being used in the experiments.
- The maximal number of mice needed to perform all experiments within the 5 years of the project will be 1300.

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 - Pancreatic cancer is a complex process involving multiple cell types (cancer cells, macrophages, fibroblasts, endothelial cells) that interact in a spatial and temporal dependent manner ultimately leading to tumor growth and metastasis. These complex interactions cannot be accurately mimicked *in vitro* and consequently we do need experimental animals. All animal experiments will however be based on *in vitro* / *ex vivo* findings, and we also aim to address follow up questions based on results of the animal experiments first *in vitro* / *ex vivo* (for instance, If the animal experiments show that macrophages are key cells in drug resistance, the underlying mechanism will first be elucidated *in vitro/ex vivo*).

Refinement - To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia and pain killing (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for signs of discomfort and apply humane endpoints (see for details section "Classification of discomfort/humane endpoints" below) . To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water.

Reduction - To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, results obtained in experiments will guide future experiments as indicated above. For the bone marrow transplantation experiments, we will use 1 donor mouse to transplant into 4 recipients and the recipients are housed in filter tops and receive antibiotics in their drinking water to prevent infections (and thus discomfort or loss of animals). Moreover, we aim to reduce the number of control groups used in the experiments by combining different experiments (if possible), and we will

minimise the number of mice to be bred by using a homozygous breeding strategy and by using both male and female mice. Finally, we will perform *ex vivo* / *in vitro* experiments using tumor-derived cells instead of *in vivo* experiments whenever possible. Importantly, from a single tumor we may obtain sufficient cells to perform an *ex vivo* experiments in 8-plo.

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

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effect on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

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.

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "pancreatic cancer", "████████████████████" and "macrophages" and we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

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 1.

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

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

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The discomfort of mice subjected to the ██████████ pancreatic cancer models consists of:

- Laparotomy under anaesthesia → pain killing used → moderate discomfort
- Tumor cell injections → under anaesthesia using pain killing → mild discomfort
- Recovery from surgery/anaesthesia → pain killing used → mild discomfort
- Injections (chemotherapeutics/drugs/inhibitors/liposomes/etc) → mild discomfort
- Side effects chemotherapeutics → moderate discomfort
- Blood sampling (only in some mice) → mild discomfort
- Tumor growth → mild discomfort for small tumors (i.e. early after tumor cell injection and/or after chemotherapeutic drugs) and moderate discomfort for larger tumors
- Irradiation of recipient mice in the bone marrow experiments → moderate discomfort

Discomfort of the donors for the bone marrow transplantation experiments:

- isolation bone marrow cells → after cervical dislocation after anaesthesia → mild discomfort

Occasionally (< 5%), mice subjected to the ██████████ model may die due to abdominal bleeding.

Overall, we expect the discomfort to be moderate

Explain why these effects may emerge.

We do not fully understand the rare occurrence of bleeding in the mice. The fact that we never observe abdominal bleedings in control (non tumor bearing) mice suggest the bleedings are related to tumor development. It may be that tumors (which are well-known to be thrombogenic in patients) induce a DIC (disseminated intravascular coagulation) phenotype due to consumption of blood coagulation factors and subsequent bleeding complications.

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

We monitor the mice for humane end points and as soon as the humane endpoints (see below) are reached, mice will be sacrificed.

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.

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched bag, walking on his toes , diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured.

Indicate the likely incidence.

Rarely (<5% of the mice).

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').

Moderate

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.

Organs and tumors have to be collected for analysis.

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).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Academic Medical Center Amsterdam	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Subcutaneous pancreatic cancer model

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Pancreatic tumors will be grown for a maximum of 8 weeks. At sacrifice, primary tumors are excised after which the size and weight are determined as primary end-point for effect of treatment (or genetic ablation in case of knock out mice). Distant organs (spleen, liver, lung, intestine) are harvested for both

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.

The aim of the current project is to study the relationship/importance of multiple cell types in pancreatic cancer. To mimic the complex interplay between cell types (both tumor cells but also immune cells recruited from the bloodstream), the subcutaneous model we propose to perform is an important model next to the [REDACTED] model. The [REDACTED] model obviously mimics the human setting into more detail, but the subcutaneous model is important to rule out that any effect observed in the [REDACTED] model is due to [REDACTED] pancreatitis which may occur due to handling of the pancreas during tumor cell injections. To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for any sign of discomfort and mice with too much discomfort (thus reaching the humane endpoint; see at point J below) will be sacrificed. To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water.

To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, we will only use the model to confirm key findings of the [REDACTED] model.

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

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effects on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

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.

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "pancreatic cancer", "████████████████████" and "macrophages" and we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

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 1.

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

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

Yes

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Tumor cell injections → under anaesthesia → mild discomfort
- Recovery from anaesthesia → mild discomfort
- Injections ([REDACTED] ([REDACTED] inhibitors) → mild discomfort
- Tumor growth → mild discomfort for small tumors (i.e. early after tumor cell injection and/or after chemotherapeutic drugs) and moderate discomfort for larger tumors

Overall, we expect the discomfort to be moderate.

Explain why these effects may emerge.

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

We monitor the mice and will sacrifice mice as soon as humane endpoint are reached.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched bag, walking on his toes, reduced mobility , diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured, (3) tumor size > 2 cm³.

Indicate the likely incidence.

Very unlikely in a subcutaneous model.

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').

Moderate

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.

Organs and tumors need to be obtained for analysis.

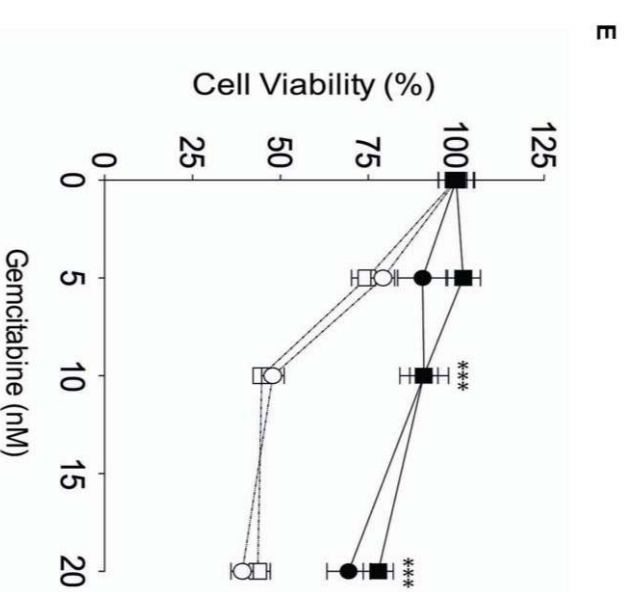
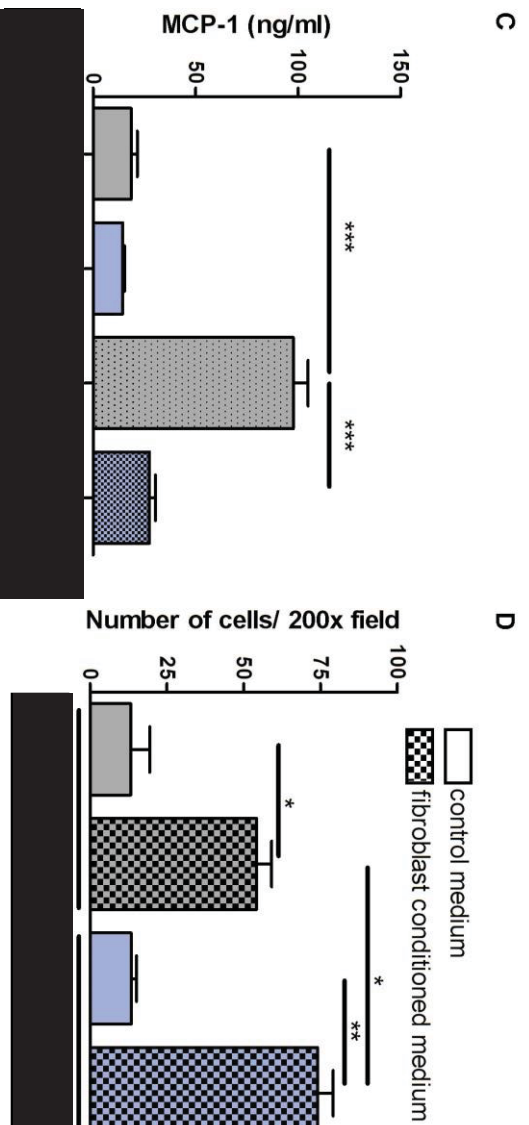
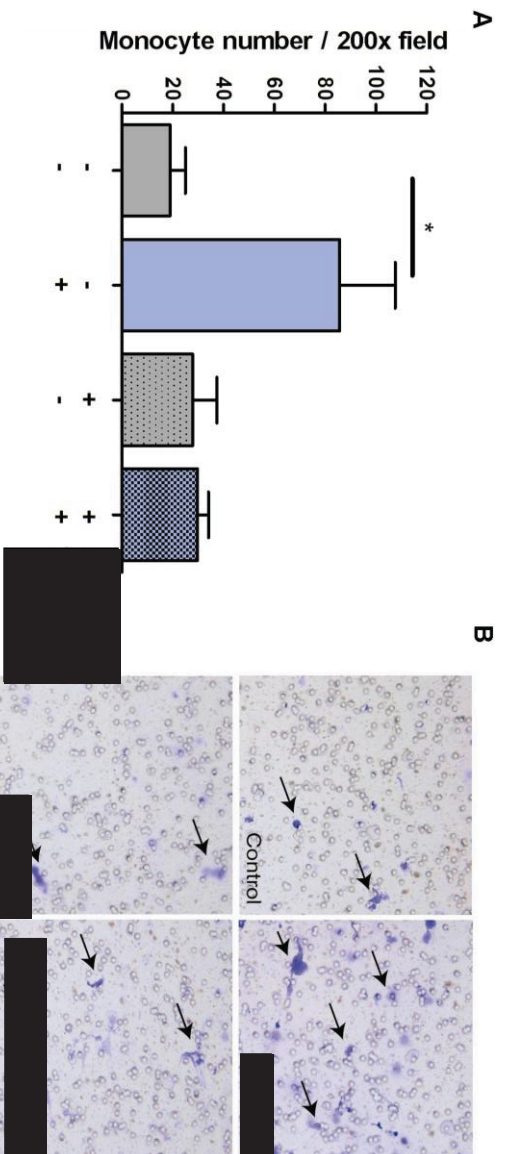
Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

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

Yes



**Appendix 1 of project entitled “[REDACTED] in
pancreatic cancer”.**

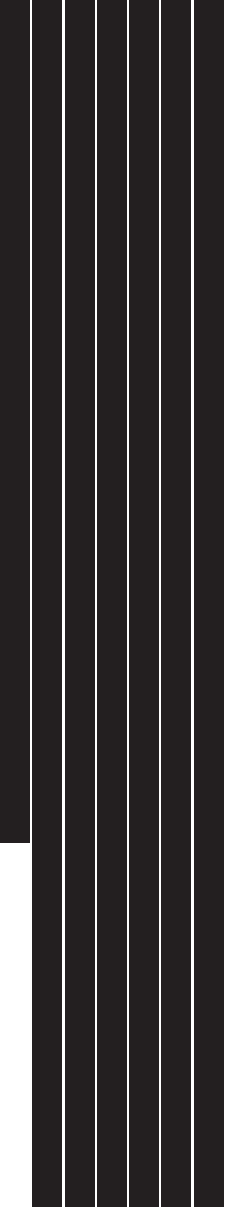
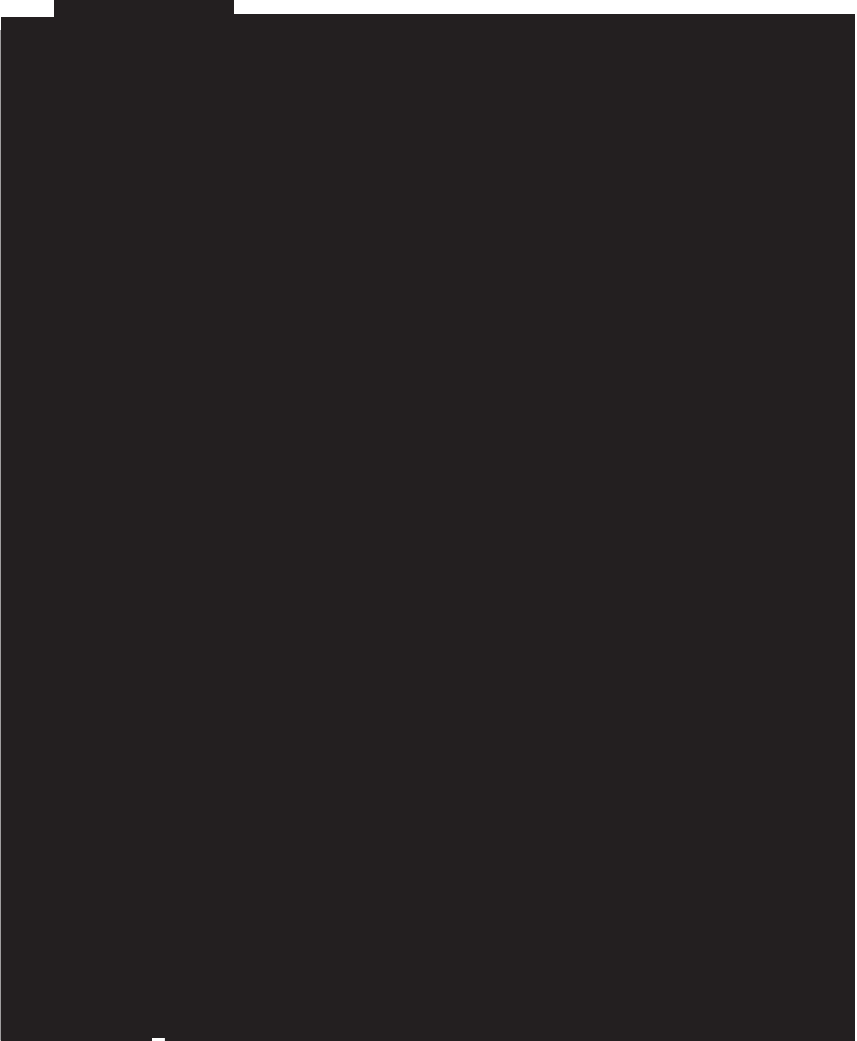


..... (A) migration of RAW264.7 cells towards MCP-1 in the absence/presence of (mean±SEM) of an experiment performed three times). (B) Representative pictures of cells migrated through the transwell. (C) MCP-1 levels in medium of C3H10T1/2 cells without or with stimulation by in the presence or absence of Shown is the mean±SEM of an experiment performed three times. (D) Migration of RAW264.7 cells towards fibroblast conditioned medium prepared in the absence or presence of RAW264.7 cell migration towards plain medium with or without was used as experimental control. Shown is the mean±SEM of an experiment performed three times. (E) RAW264.7 conditioned medium induces gemcitabine resistance of cells. Compare black squares/circles (RAW264.7 conditioned medium) with open white squares/circles (control medium). Shown are the mean±SEM of two independent experiments performed in octuplo.

A



B



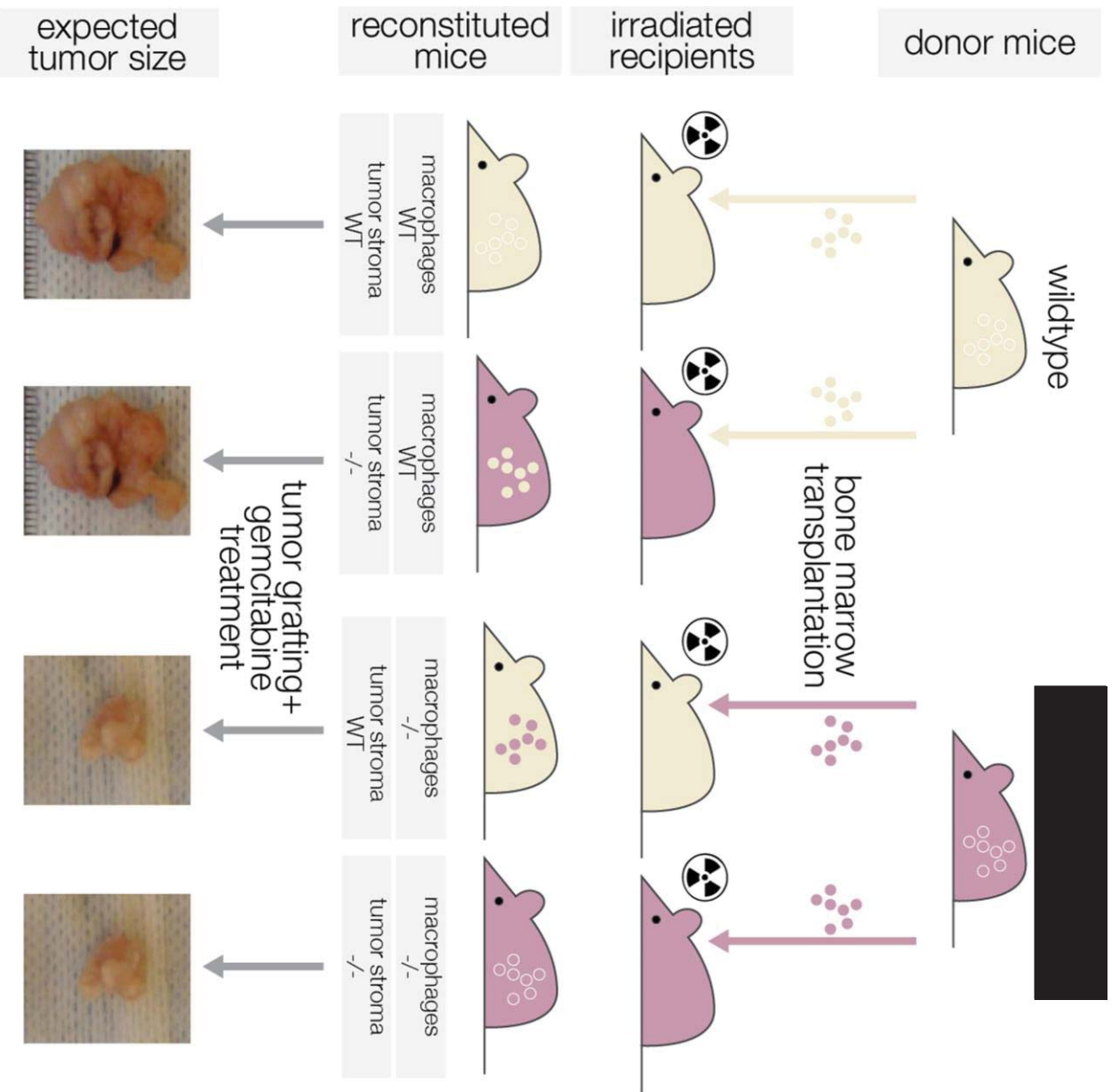


Figure 3: Bone marrow transplantation experiments to identify the cell types involved in driven pancreatic cancer growth and drug resistance. Bone marrow obtained from wild type mice will be transplanted into irradiated wild type (control) and recipient mice, whereas bone marrow obtained from mice will be transplanted to irradiated (control) and wild type recipient mice. Six weeks later, mice are subjected to the pancreatic cancer model in the absence or presence of gemcitabine. If (for instance) macrophage determines gemcitabine resistance, we expect large tumors in mice containing wild type bone marrow and small tumors in mice containing bone marrow.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medical Centre Amsterdam

Meibergdreef 31

1105 AZ AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD118002015222

Bijlagen

2

Datum 20-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 18 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002015222. 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. 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

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 :

30 augustus 2020

Titel project:

[REDACTED] in pancreatic cancer

Titel niet-technische

Beterre chemotherapie bij alveeskliekeranker

samenvatting:

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef 31

E-mailadres DEC:

dec@amc.nl

Betalgegevens

De leges bedragen:

€ 741,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting
 DEC-advies

Overige bijlagen:

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

18 augustus 2015



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medical Centre Amsterdam

Meibergdreef 31

1105 AZ AMSTERDAM



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD118002015222

Bijlagen

2

Datum 20-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 augustus 2015

Vervaldatum: 19 september 2015

Factuurnummer: 201570222

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven	€ 741,00
Betreft aanvraag AVD118002015222	

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.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <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 10500	
		<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	Universitair Medisch Centrum Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7
		Staat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	[REDACTED]
		Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN
		IBAN	NL80ABNA0446049352
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input 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	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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?
- | |
|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag |
| <input type="checkbox"/> Nee |

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- | |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2 |
| <input type="checkbox"/> 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?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier |
| <input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
| <input type="checkbox"/> 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 9 . 2 0 1 5 |
| Einddatum | 3 1 . 0 8 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| Organ protection in cardiopulmonary bypass. |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Orgaanbescherming in cardiopulmonaire bypass chirurgie |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.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.
- 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
- 1 description

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[Redacted]
Functie	Hoogleraar RUG
Plaats	Groningen
Datum	19-08-2015
Handtekening	[Redacted]



Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **(Intern RuG code 8020)**
2. Titel van het project: **Organ protection in cardiopulmonary bypass**
3. Titel van de NTS : **Orgaanbescherming bij cardiopulmonaire bypass chirurgie**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: **[REDACTED]**
 - mailadres contactpersoon : **[REDACTED]**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **08-07-2015**
 - aanvraag compleet: **08-07-2015**
 - in vergadering besproken: **16-07-2015**
 - anderszins behandeld: 04-08-2015, 11-08-2015
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **17-07-2015 tot 03-08-2015, 11-08-2015 tot 12-08-2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **03-08-2015, 12-08-2015**
 - advies aan CCD: **13-08-2015**
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)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **17-07-2015, 11-08-2015**
- Strekking van de vraag / vragen : **Vragen m.b.t. enige inhoudelijke verduidelijking en nadere onderbouwing aantallen dieren**
- Datum antwoord: **03-08-2015, 12-08-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en)
De antwoorden hebben geleid tot verduidelijking van de inhoud en een nadere onderbouwing van de aantallen dieren.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet): **ja**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag: **ja**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
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. Het project is:
x uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **ja**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel** belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **ja**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **geen bijzonderheden**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **ja**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven: **ja**. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat: **ja**. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt: **ja**
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: **ja**. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd: **ja**.

D. Ethische afweging

De DEC is van oordeel dat de wetenschappelijke en maatschappelijke doeleinden van het project het voorgestelde gebruik van dieren rechtvaardigen. Het project is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project belangrijke voordelen opleveren voor mens, omdat het kan leiden tot een nieuwe, preventieve behandelmogelijkheid om orgaanschade bij open-hart chirurgie te voorkomen. De proefopzet van (de onderdelen) van dit project is bovendien zodanig dat schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt, met in achtneming van de 3 V's.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is unaniem door de DEC genomen.



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10500				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen				
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	<table><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Cardiopulmonary Bypass and [REDACTED]</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Cardiopulmonary Bypass and [REDACTED]
Serial number	Type of animal procedure				
1	Cardiopulmonary Bypass and [REDACTED]				

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

[REDACTED]

[REDACTED] With reference to [REDACTED] we seek to collect serial data of animals [REDACTED] regions over time.

Rats will undergo a CPB procedure according to the protocol below. [REDACTED]

[REDACTED]

Initial experiments (1) [REDACTED]

[REDACTED] In a subset of animals, (2) we will undertake [REDACTED] testing prior to and after CPB procedure. Subsequent cohorts will be

randomized (3) to analyze the efficacy of [REDACTED] compounds at optimal time points. After sacrifice organs of rats will be submitted to molecular and histological examination to confirm [REDACTED]

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

The CPB-protocol

The experimental protocol for the CBP is [REDACTED] from the model for extracorporeal circulation in the rat, as developed by Grocott et al. In particular, [REDACTED]

Anesthesia:

Anesthesia will be induced (2-3% isoflurane in O₂/air (1:1)) followed by tracheal intubation and mechanical ventilation. Tidal volume will be set to achieve normocapnia (verified arterial blood gas analysis), with O₂/air (0.5:1) at 50 min⁻¹. A cannula will be inserted in the tail vein to administer intravenous anesthetics. Atropine (40 µg kg⁻¹) is administered to prevent respiratory problems due to excessive secretions in the post-surgical period. [REDACTED]

Specific anesthetic techniques include:

- isoflurane anesthesia (2-3%)
- propofol/fentanyl anesthesia; bolus dose propofol (80 mg/kg-1), intravenous fentanyl (125 µg kg-1.hr-1), and propofol (40 mg kg-1.hr-1) using target controlled infusion (TCI)
- sevoflurane anesthesia (2-3%)

[REDACTED]:

- [REDACTED] °C
- [REDACTED] °C
- [REDACTED] °C
- [REDACTED] °C

Instrumentation/cannulation:

The left femoral artery will be cannulated for blood pressure monitoring. The mean arterial pressure will be kept between 70 and 100 mm-Hg by adjusting the isoflurane concentration as necessary (typically between 2.0-2.5%). Immediately before insertion of the arterial line, 300 IU kg⁻¹ heparin will be administered. A rectal temperature probe is placed and continuously monitored. To enable CPB, the right carotid artery will be cannulated for arterial inflow using a 22-gauge catheter; a multi-orifice 4.5 French cannula will be advanced into the right heart using the right jugular vein for access.

Extracorporeal circulation:

[REDACTED]

Sham procedure:

Rats that are sham-operated will receive the same treatment as CPB-treated animals, but without the extracorporeal circulation. Cannulas and instrumentation will be inserted and anesthesia as described under "Anesthesia " is matched to those of CPB animals. Blood samples will be drawn at the same time-points as in CPB-treated animals and the same post-operative protocol will be followed as for CPB-treated animals.

Administration of compounds

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

A power-analysis was performed based on data from previous studies in the CPB model accomplished in our institute. Based upon previous studies, we anticipate that n = 8 will be a sufficient group to detect potential differences in neuroinflammation after intervention. Given the fact that not all experiments will result in valid data due to the complexity of the procedure we experienced a drop out of 0 to 2 rats per group. Thus we estimated our grand total based

on n = 10 per group.

B. The animals

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

We intend to use male adult Wistar rats, obtained from Harlan.

The choice for rats (rather than mice) was based on the fact that their circulating blood volume is better compatible with the extracorporeal circulation circuit.

Preoperative required data [REDACTED] will eliminate the necessity of a control group.

For an estimate of the amount of animals, here is an overview of the interventions that will be compared:

Overview of groups and calculation of the estimated number of animals:

(2 groups CPB (being 6 hours + 3 days and 1 + 7 days [REDACTED] + 1 sham) x 3 anesthetics = 9

9 + 16 + 4 + 6 = 35 groups of rats

We calculated total numbers of rats as follows:

In a sample size calculation we calculated the necessity of 10 rats per group.

Thus, total numbers of rats = 35 groups x 10 rats/Group = 350 rats

The estimated number of animals in this experiment will thus be approximately 350 rats.

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.

Regarding the complexity of the physiological and pathological processes that occur peri- and postoperatively, it is not possible to perform these studies in vitro or in silico. [REDACTED] which minimized the loss of animals peri- and postoperatively. Perioperative monitoring was optimized by the purchase of a pulse-oximetry apparatus specifically developed for rodents. The technical staff has experience with the model. The choice for rats (rather than mice) was based on the fact that their circulating blood volume is better compatible with the extracorporeal circulation circuit.

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

The procedure will be performed in a quiet environment to minimize fear and stress in the phase when animals are not completely anesthetized. During the procedure we will frequently check whether animals are anesthetized deep enough. Dosage of anesthetic agents will be adjusted to this. Postoperative pain and suffering will be attenuated by a subcutaneous injection of buprenorphine that is given to all animals during the procedure as standard care. The rats will recover quietly and will be monitored closely in the postoperative phase. When there are signs of postoperative pain during their stay in the animal housing accommodation, than another injection of buprenorphine will be administered once more.

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.

To determine whether others have performed a similar study, a literature search was conducted in PubMed with the searching terms: (rat or Wistar) AND (CPB, extracorporeal circulation, or cardiopulmonary bypass) [REDACTED]
[REDACTED] The experiments that we are planning have never been reported by another group before.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

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.

Administration of buprenorphine 0,05 mg kg⁻¹ subcutaneously during the procedure and when the animal is showing signs of discomfort 1-3 times postoperatively. We chose not to give NSAID's as this might disturb the development of [REDACTED]

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress

Explain why these effects may emerge.

1. The fact that the animal will undergo CPB procedure
2. Becoming under anesthesia.
3. Administration of intraperitoneal and subcutaneous injections.
4. Transportation of the animal from the housing accommodation to the animal laboratory where surgery is performed and to the [REDACTED]
5. [REDACTED]

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

1. The procedure will be performed in a quiet environment with the attempt to minimize the handling of the animals when they are not anesthetized.
2. Induction of anesthesia until the animal has lost reflexes.
3. Frequency of injections is attempted to the minimal amount necessary.
4. The animal laboratory is adjacent to the housing accommodation.
5. [REDACTED]

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 may not recover adequately from the CPB procedure itself, as it is known to induce multiorgan failure in some individuals. If suffering is observed or expected before planned sacrifice, we will terminate the animals at an earlier time-point. We will also terminate animals if they do not recover from the anesthesia during three hours after the termination of anesthesia. If animals show signs of severe discomfort (lying in a curled up position, no movement, no grooming) despite opioid administration, they will be terminated. As a humane endpoint we will also use >15% loss of body weight.

Indicate the likely incidence.

< 10% 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').

Total burden of animals in this project is estimated as moderate/severe discomfort:

CPB model - intubation for mechanical ventilation, cannulation of the carotid artery, jugular vein, and femoral artery
Postoperative stage - wound pain and recovery of physiological respiration and circulation
Administration of compounds during procedure
Subcutaneous injection postoperatively for administration of analgesics (1-3 times)

Mild discomfort
Moderate discomfort
No additional discomfort
Mild discomfort

Euthanasia under anesthesia by exsanguination according to Annex IV of Directive 2010/63/EU

Non-recovery

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.

Afterwards an organ retrieval will be performed, that will allow protein analysis and immunohistochemistry on [REDACTED].
Blood samples will be taken to allow various biomarkers to be analysed.

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



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries



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.

In cardiac surgery, the usage of the heart-lung machine, also called cardiopulmonary bypass (CPB) is widespread, as this enables surgery upon a non-beating heart. CPB is a form of extra-corporeal circulation where blood is oxygenized in an artificial lung and then given back to the patient. In order to prepare the human body for these major physiological alterations and improve postoperative outcome, measures are taken such as heparinization of blood to prevent clot formation, cardiac arrest, cooling for organ preservation, and the possibility of postoperative autologous blood transfusion by using the Cell-Saver. The effects of CPB have been investigated thoroughly in humans, as it is accompanied by high incidence of organ damage. Several consequence of CPB are held responsible for the development of this damage, such as systemic inflammation, ischemia/reperfusion injury, reactive oxygen species (ROS), hypoxia, and non-pulsatile flow. Many studies indicate that acute kidney injury (AKI) is common and has a negative influence on post-operative survival. Even a temporary decrease in kidney function has long-lasting effects on mortality rates.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

References

[Redacted text block]

[Redacted text block]

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?

[Redacted text block]

[Redacted text block]

References

[Redacted text block]

3.3 Relevance

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

Scientific impact:

[REDACTED]

Societal relevance:

This project will generate mechanistic insights into damage related to commonly performed surgical procedures, namely CPB-assisted cardiac surgery. Daily, 107 men and women die from a cardiac disease in the Netherlands alone, adding up to approximately 39.000 patients per year. Cardiac disease has nowadays become the primary cause of death in women.(8)

[REDACTED]

8. Website of De Nederlandse Hartstichting; Feiten en cijfers. <https://www.hartstichting.nl/hart-vaten/cijfers>; consulted on 13-05-2015

3.4 Research strategy

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

This project consists of four major activities:

- (1) [REDACTED]
- (2) [REDACTED]
- (3) [REDACTED]
- (4) [REDACTED]

[REDACTED]

■ [REDACTED]

To limit the use of animals, intervention studies listed under 3 may be combined with studies under 1 and 2 to avoid inclusion of additional control (i.e. untreated) groups. Although not expected, no go criteria would involve serious adverse events following CPB despite adequate opioid administration, defined as humane endpoints (e.g. lying in a curled up position, no movement, no grooming). If these humane endpoints occur in more than 5 animals subsequently, we will arrange an animal welfare meeting at our institute in order to revise our methods and search for solutions.

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.

[REDACTED]

■ [REDACTED]

■ [REDACTED]

[REDACTED]

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

Using the established model of cardiopulmonary bypass in the rat, this project seeks to analyse the systemic damaging effects of the procedure on the brain and other tissues. In the first part of the project, a comprehensive overview of the development and localization of neuroinflammation in the rat after CPB will be made. Both effects of anesthetic techniques and of specific interventions are assessed. Previous research has led to the development of a novel class of compounds (see above). These will be tested in the CPB model as a continuation. The phasing of the project is explained above.

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	Cardiopulmonary bypass and [REDACTED]
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002015223

Bijlagen

2

Datum 21-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015223. 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. 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: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: ██████████
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: MD-PhD Candidate
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

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: Organ protection in cardiopulmonary bypass.
Titel niet-technische samenvatting: Orgaanbescherming in cardiopulmonaire bypass chirurgie
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1 (HPC FA 29)
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.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: 
Plaats: Groningen
Datum: 19 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen
p/a [REDACTED]
9713 AV GRONINGEN
[POSTNET]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002015223
Bijlagen
2

Datum 21-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 augustus 2015
Vervaldatum: 20 september 2015
Factuurnummer: 201570223

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015223	€ 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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1
9713 AV GRONINGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002015223

Datum **24 SEP. 2015**
Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer

Op 20 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Organ protection in cardiopulmonary bypass." met aanvraagnummer AVD105002015223. 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 "Organ protection in cardiopulmonary bypass." starten. De vergunning wordt afgegeven van 24 september 2015 tot en met 31 augustus 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 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. 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 zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven,

afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvoorstel
 - 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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 31 augustus 2020, voor het project "Organ protection in cardiopulmonary bypass." met aanvraagnummer AVD105002015223, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 september 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 september 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 augustus 2015, ontvangen op 21 augustus 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Cardiopulmonary bypass and PET-scans	Ratten (Rattus norvegicus) / Wistar ratten, Harlan	350	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <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 10700 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Maastricht University</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Maastricht University	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50169181									
Naam instelling of organisatie	Maastricht University																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	50169181																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td><td>4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD</td><td>Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6	Postbus	616		Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht	IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6															
Postbus	616																
Postcode en plaats	6200 MD	Maastricht															
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><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]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><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>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>Kindergeneeskunde</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	Onderzoeker		Afdeling	Kindergeneeskunde		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker																
Afdeling	Kindergeneeskunde																
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 | 01 - 12 - 2015 |
| Einddatum | 01 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Therapeutic interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Therapeutische maatregelen om de uitkomst van prematuren kinderen te verbeteren.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-UM |
| Postadres | Postbus 616 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | Secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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
- Referentielijst

6 Ondertekening

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

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED] - Universiteit Maastricht
Plaats	Maastricht
Datum	21-08-2015 [REDACTED]
Handtekening	[REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Preterm birth

Preterm birth, defined as birth before 37 weeks of gestation, is the leading cause of perinatal morbidity

and mortality in developed countries (1). Survival after preterm birth has sharply increased in the last decades (2). This positive trend can be largely contributed to reduction of early pulmonary complications, which has been established by widespread use of antepartum corticosteroids, postpartum surfactant administration and the development of improved ventilation strategies (2, 3). Unfortunately, preterm birth is still associated with mortality and long-term morbidity, despite the mentioned improvements in perinatal care. Given the magnitude of the problem of preterm birth, such a large scale health care challenge also forms a tremendous economic burden on society. The most important causes leading to preterm birth can be roughly divided in two major groups; intrauterine infection (chorioamnionitis) and fetal hypoxia-ischemia.

Chorioamnionitis

Chorioamnionitis is characterized by microbial invasion of the amniotic cavity. The microorganisms responsible for this invasion, comprising *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, and *Gardnerella vaginalis*, most commonly originate from the lower reproductive tract (4). These microorganisms cause an inflammatory reaction of the fetal membranes (chorion and amnion), leading to release of inflammatory mediators into the amniotic fluid. As the fetus practices breathing and swallowing movements, the fetus is exposed to these micro-organisms and inflammatory mediators entering both the fetal digestive tract and the lungs, causing a fetal inflammatory response syndrome (FIRS), and subsequent injury to vital organs (e.g. lungs and brain). Moreover, the inflammatory cascade triggered by chorioamnionitis (e.g. release of prostaglandins and extracellular matrix degrading proteins) leads to (medically indicated) preterm delivery (5).

As outlined above, chorioamnionitis and/or preterm birth affect vital organ systems, most importantly the respiratory (lungs) and central nervous system (brain):

Lungs

Respiratory distress syndrome

When infants are born preterm, their lungs are still immature, and not capable of production of surfactant. Surfactant lowers alveolar surface tensions. As a result of absence or an inadequate amount of pulmonary surfactant a premature baby often has difficulty expanding her lungs, thereby denying proper gas exchange, often referred to as respiratory distress syndrome (RDS).

Currently, RDS is prevented by surfactant replacement therapy in which tracheal administration of exogenous surfactant (of animal origin) lowers alveolar surface tension and improves pulmonary dynamic compliance. Surfactant replacement therapy has been the most significant advance in perinatal care to decrease neonatal mortality since the late 1980's.

Yet, these biological surfactant preparations are prone to in vivo inactivation as a result of plasma proteins leaking into the airways from areas of epithelial disruption and injury, mandating development and testing of new surfactant preparations that are more resistant to inactivation (6).

CHF 5633 is a fully synthetic surfactant containing two phospholipids and two peptides analogues of human surfactant proteins B and C, designed to be resistant to inactivation (6). Sato et al. demonstrated a superior oxygenation and lung compliance in ventilated preterm lambs treated with CHF 5633

compared to other, animal-derived surfactant preparations (7). Moreover, we previously reported CHF 5633 was more resistant to *in vivo* inactivation compared to animal-derived surfactant preparations and improved oxygenation and lung function of preterm lambs that were surfactant deficient due to their prematurity (6).

Since (persisting antenatal) inflammation is clinically a major contributor to surfactant inactivation and RDS, we aim to assess inactivation of synthetic and natural surfactant preparations in a clinically relevant animal model of RDS in which preterm ovine fetuses are exposed to antenatal inflammation (chorioamnionitis) and treated postnatally with surfactant replacement therapy.

Bronchopulmonary dysplasia

Antenatal exposure to inflammation accelerates lung maturation. However, by inducing accelerated early lung maturation, late lung development is impaired (8, 9). During the last phase of lung development which is called the alveolarization phase, functional alveoli are formed by secondary septation which subsequently increases the surface area needed for optimal gas exchange (10). Impairment of late lung development by intrauterine exposure to inflammation, will lead to a decreased number of alveoli and less surface area for gas exchange which eventually impairs the lung function of the newborn. This altered lung morphology can form the basis for bronchopulmonary dysplasia (BPD) (11). BPD is the most common chronic lung disease in preterm infants (12). Apart from intensive hospital care in early life, BPD infants also have an increased risk for recurrent respiratory complications such as wheezing and respiratory infections, and neurodevelopmental disabilities (13, 14). To date no effective treatment is available for BPD. Dysregulation of the pathways driving the alveolar growth by antenatal exposures could potentially result in disrupted lung morphology as seen in BPD patients.

The pathophysiological sequence leading to BPD is induced by lung immaturity combined with lung injury (15, 16). The latter is induced by inflammatory and airway remodeling processes, which are caused by **mechanical ventilation**, and/or **ante- or postnatal infections**. Especially, certain prenatal hits (e.g. chorioamnionitis) may prime the response of the immature lung, making it more vulnerable to postnatal hits (17, 18). This is of importance of the subsequent injuries or "hits" that the preterm lung may suffer. Mechanical ventilation is a risk factor per se for lung injury which may be aggravated by preceding injuries in a non-linear way. Two injuries are more than the addition but a potentiation of injury. Several sophisticated mechanical ventilation strategies have been clinically tested to reduce the incidence of BPD, which all failed to show improvement in clinical outcome.

Because inflammation significantly contributes to lung injury in BPD, glucocorticoids have long been used as standard treatment of BPD, resulting in a reduced inflammatory response along with reduced lung damage in the preterm lungs (15, 16). But due to the risk of short- and long-term side effects, including impairment of neurological development, the routine use of **POSTNATAL** glucocorticoids has been drastically reduced in BPD therapy in the last years, and increased the demand for new therapeutic options for the treatment of BPD.

PDE4 inhibitors are very promising as a new treatment option for BPD. At present, PDE4 inhibitors are under development which appear to be effective in treating different lung diseases like COPD and asthma (19). Because of their anti-inflammatory properties and their protective effect on remodelling processes, PDE4 inhibitors are promising as a potential new therapeutic option for the treatment of

preterm infants with BPD. Studies in small animal models demonstrated a protective effect of PDE4 inhibitors on BPD development through anti-inflammatory action and reversal of aberrant remodeling processes combined with prolongation of survival (20-23). However, a major challenge in a treatment using PDE4 inhibitors is that the dose level required for therapeutic activity is about the threshold level for an induction of adverse effects. One option to reduce these systemic adverse effects could be the use of inhaled PDE4 inhibitors, of which the compound GSK256066 yielded the most promising results (24). So far, GSK256066 has been investigated in clinical studies relating to asthma (25) and COPD (26). It was well tolerated and produced no systemic adverse effects (in adults) (24, 26). Since BPD development is dependent on lung immaturity and lung injury caused by antenatal inflammation and postnatal ventilation, we aim to assess treatment of BPD in a preclinical animal model of BPD in which preterm ovine fetuses are exposed to antenatal inflammation (chorioamnionitis) followed by postnatal mechanical ventilation and/or PDE4 treatment.

Hypoxic-ischemia

Fetal hypoxia-ischemia (HI) is a severe condition and defined as a period of insufficient blood gas exchange leading to progressive hypoxia, hypercapnia, metabolic and/or respiratory acidosis and eventually ischemia resulting from a disturbed fetal-maternal circulation(1).

HI affects different organ systems. However, due to its high metabolic rate and energy need, the brain is one of the most vulnerable organs with limited regenerative capacity and HI can cause severe hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). Despite the high prevalence of neurological sequelae, therapeutic options to improve the neurodevelopmental outcome in **preterm** infants after HIE are unavailable. In mild cases of HIE in **term** infants whole body cooling therapy has been shown to improve neurodevelopmental outcomes. Cooling therapy is an independent risk factor for adverse neurological outcomes in **preterm** infants and therefore is not standard clinical care for this vulnerable patient group, indicating the demand for new therapeutic options for this vulnerable patient group.

In the last decade, stem cell therapy has emerged as a putative treatment for neonatal ischemic injury (27). Bone marrow-derived stromal cells (MSC) have great therapeutic potential in the field of neonatal regenerative medicine due to their immune modulatory and regenerative capacities (28). The immune modulatory effects of MSCs consist of modulation of both innate and adaptive immunity in favor of anti-inflammatory properties (28, 29). Therefore, MSCs have been studied as therapeutic intervention in many neonatal diseases in which inflammation or pathogenic immune responses play a key role in pathophysiology including bronchopulmonary dysplasia and brain injury (27). Although the exact mechanisms remain largely unknown, general consensus is that MSC-mediated immunomodulation is predominantly caused by the **paracrine effect** mediated by soluble factors secreted by MSCs (28). This concept is the motivation to move towards a new treatment of preterm babies with cell preparations or cell free excretions of highly specified stem-cell populations. Our concept will identify mechanisms and proof efficacy which will form the basis for the subsequent choice of stem cells that are then tested against cell-free preparations of secreted vesicles from bone marrow derived stromal cells. The effectiveness of such a preparation is the current limit of knowledge which we intend to test. The treatment with secreted vesicles rather than livable stem cells is a simplification of treatment which would make the move into clinical trials for the benefit of patients much faster and easier since concerns

of immunogenic compatibility and cell fate need not to be addressed.

Previously we have demonstrated that bone marrow-derived stromal cells are effective for the treatment of HI-induced injury of the preterm brain (30, 31). Based on the results of, amongst others, this study we postulate that the protective effects of cell-based therapies are **spleen-mediated**; splenic immune cells migrate towards the brain after global HI. Stem cells alter the composition and (re)activity of splenic immune cells (both innate and adaptive) and prevent their migration towards the brain (30-32).

In order to improve our current therapeutic approach, we aim to further explore the splenic response towards the brain after HI and/or cell-based therapies.

Besides brain injury, fetuses which suffered from hypoxia-ischemia are at high risk to develop adverse clinical outcomes of the fetal intestine such as feeding intolerance, altered intestinal motility (33) and necrotizing enterocolitis (NEC) (34), the most severe, life threatening gastrointestinal pathology in preterm neonates. Intestinal hypoxia-ischemia leads to impaired barrier epithelial integrity and delayed gastrointestinal transit (unpublished data). This is a relative new concept of so called gut-brain axis which describes the link between brain innervation of the gut and function of the gut. In order to evaluate gut function, a sugar-based permeability test will be performed. A solution composed of small (evaluate intracellular passage) and a large (evaluate paracellular passage) sugar probes will be infused into the stomach of the fetuses by gastric tube and the concertation of the large/small sugars will be measured non-invasively *in vivo*, in plasma to assess changes in gastrointestinal permeability between the groups. The motility of gastrointestinal tract will be assessed by evaluating the distribution of rhodamine-B-labeled in the bowel of the fetuses. Rhodamine will be infused into the stomach of fetuses by gastric tube and differences in the rhodamine-containing gut content between the groups will be quantified at sacrifice.

Administration of sugars for gut motility and absorption purposes does not interfere with our proposed cell-based therapies, but will be a read-out for the effects of our therapies with respect to the gut-brain axis. The addition of this read-out will prevent the use of additional animals for gut motility and absorption purposes only and reduces the overall number of animals.

Lungs

BPD has been addressed in preclinical trials to test the efficacy of stem cell therapy in different animal models. Recent experimental trials demonstrated that systemic administration of MSCs had direct positive effects on the degree of inflammation. Moreover, tissue remodeling could be demonstrated after administration of MSCs. Furthermore, markers of surfactant homeostasis were found to be increased after administration of MSCs. Moreover, protection from further progression of lung remodeling could be demonstrated (27).

3.2 Purpose

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

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

The **main purpose** of this research project is to improve perinatal management by developing novel

therapeutic strategies to improve neurological and pulmonary outcomes.

AIM 1: Identifying a surfactant replacement therapy (CHF 5633 vs. Surfaxin vs. Curosurf vs. Control) resistant to inactivation by inflammation/infection.

AIM 2: To assess the effects of pharmacological PDE-4 inhibition (GSK256066) of developmental pathways on BPD development. vs control

AIM 3: Improve structural and functional brain injury with cell-based therapy

AIM 3a: To assess the temporal dynamics of the cerebral and peripheral immune response in the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury.

AIM 3b: To assess the role of the spleen in the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury.

AIM 3c: To test intravenous administration of cell-based therapies from different sources: bone marrow-derived stromal cells, cell-free preparations of bone marrow-derived stromal cells, preconditioned stem cell preparations for their effectiveness in reducing hypoxic-ischemic brain injury.

AIM 3d: Define the optimal dosing strategy for the most effective cell-based therapy.

AIM 3e: Assess long-term effects of cell-based therapies on neurodevelopmental outcomes.

3.3 Relevance

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

General relevance:

Preterm birth is the leading cause of perinatal morbidity and mortality in developed countries. In the Netherlands. Although survival after preterm birth has increased in the last decades, still a large proportion of preterm infants suffer from long term morbidity and disability, which have a tremendous impact on patients and their families.

Epidemiology:

Preterm birth: 13649 (7,7% or 77 per 1000 live and dead born children)

Of the 13649 preterm infants, 1148 infants died due to preterm birth alone or complications of preterm birth (e.g. asphyxia, respiratory insufficiency)

Extreme preterm: 2637 (20% of preterms) of whom 1/3 dies; 1/3 survives with handicap and 1/3 survives without morbidity.

In 25-40% of preterm births are caused by intra-uterine inflammation (chorioamnionitis).

Gestational age (weeks)	Live and dead born	
	number	percentage
22-24	630	0,4
25-31	2.007	1,1
32-36	11.012	6,2

≥ 37	162.625	91,5
unknown	1.439	0,8
Total	177.713	100,0

Brain:

Cognitive, socialization, attentional and/or behavioral disorders: 25-50% of preterm infants

Spastic motor deficits (e.g. cerebral palsy): 5-10% of preterm infants

Lung:

Bronchopulmonary dysplasia: 20% of preterm infants

We will conduct relevant experiments in preclinical/translational animal models in order to improve the outcome of this highly susceptible patient group by addressing different approaches:

Surfactant replacement therapy

Surfactant is a mixture of phospholipids and proteins that decreases surface tension in the alveoli, preventing its collapse and facilitating oxygen exchange. Surfactant replacement therapy is an **absolute necessity in neonatal care**. Without surfactant, survival of preterm neonates drastically decreases.

1. Increasing resistance of surfactant to inactivation will result in maintenance of tissue oxygenation and, therefore, prevent possible hypoxic insults that are detrimental to the developing brain.

Phosphodiesterase 4 (PDE4) inhibition

Despite surfactant replacement therapy, preterm infants develop long term complications such as **bronchopulmonary dysplasia** (BPD), which is an irreversible simplified lung structure resulting in reduced oxygen uptake and continuous oxygen demand. BPD is the result of injury of the immature lung caused by (1) mechanical ventilation and (2) ongoing inflammation. PDE4 inhibition results in reduction of inflammation and stimulation of airway remodelling processes.

1. **PDE4 prevents BPD** and its long term consequences
2. Inflammation is a key process resulting in adverse neurodevelopmental outcomes. **PDE4 reduces inflammation** and, therefore, potentially prevent brain injury.
3. Prevention of BPD results in **improved tissue oxygenation**, thus meeting the high oxygen demand of the brain and prevents secondary brain injury.

Cell-based therapies

Cell-based therapies (1) are immune modulating and (2) stimulate regenerative processes. Key process in development of preterm lung and brain injury is inflammation.

1. Cell-based therapies will **reduce inflammation**, thereby preventing its detrimental effects on fetal development
2. Injury to the lungs and brain often is already present before start of therapy. Since cell-based therapies also have **regenerative properties**, this initial damage might be restored.

Cell-based therapies, therefore, prevent continuation of detrimental processes and restore existing injury.

Moreover, transplantation of living cells (bone marrow-derived stromal cells and their derivatives) has proven safe with respect to malignant transformation and is currently being tested in human (adult) clinical studies for other diseases (e.g. graft versus host disease, stroke, inflammatory bowel disease).

Furthermore, the use of stem cells derivatives (e.g. extracellular vesicles) evades this risk since these biological active vesicles are non-self-replicating. However, back-to-back comparisons with living cells remain crucial.

3.4 Research strategy

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

In the current project we have formulated three individual experimental aims to develop and improve new therapeutic strategies for the treatment of perinatal insults in well-established ovine models of intra-uterine inflammation, mechanical ventilation, and global hypoxia-ischemia (HI).

Ovine fetal development, in terms of lung alveolarization and white matter development, is comparable to human fetal development: both processes start prenatally and continue postnatally, whereas these processes start postnatally in rodents (figure1).

Moreover, the size of the ovine fetus allows for chronic *in utero* instrumentation (hypoxia-ischemia model) and allows the use of ventilation equipment and ventilation strategies currently used in clinical practice.

Furthermore, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes.

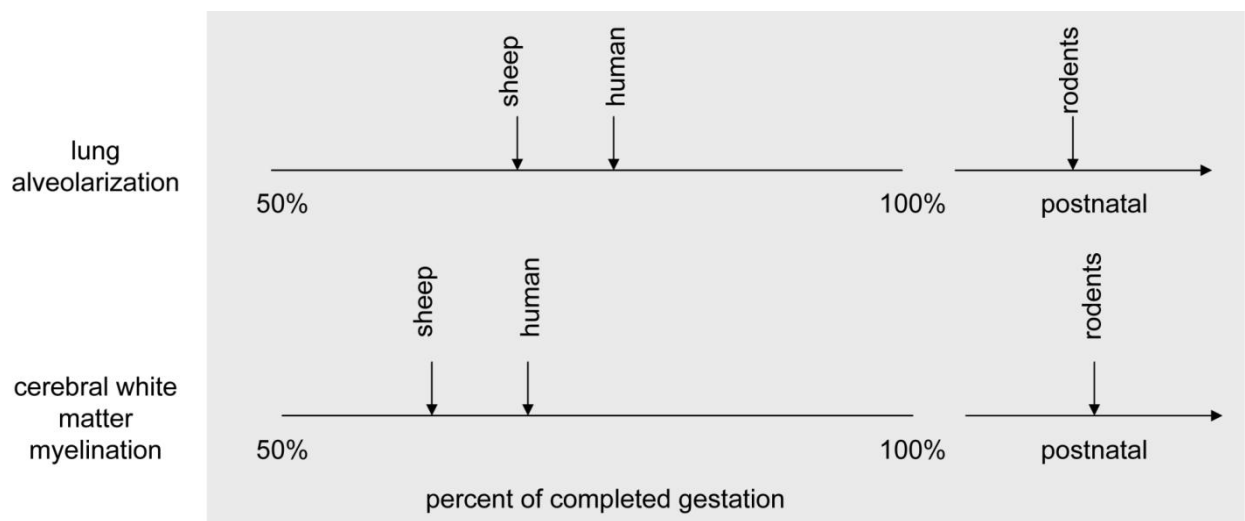


Figure 1 Lung and brain development during gestation in humans, sheep and rodents.

We will focus on the interaction between **(AIM 1)** intra-uterine inflammation (chorioamnionitis) and surfactant replacement therapy during mechanical ventilation, **(AIM 2)** chorioamnionitis, ventilator-induced lung injury and a novel therapeutic agent, and **(AIM 3 a-e)** global hypoxia-ischemia and cell-based therapies.

The objective of this project is to develop novel treatment strategies to reduce the pulmonary and neurodevelopmental sequelae of the most common underlying pathologies in preterm birth; asphyxia and chorioamnionitis. For this purpose, we generated the following three main research questions in this project:

Intra-uterine inflammation:

1. What surfactant preparation is least susceptible to *in vivo* inactivation induced by antenatal inflammation (chorioamnionitis) and mechanical ventilation?

Persistent (antenatal) inflammation is a major contributor to inactivation of biological surfactant preparations and subsequent RDS in preterm infants and therefore the inactivation of new surfactant preparations cannot be tested in healthy animals. Synthetic surfactant has proven superiority in terms of resistance to inactivation when compared to biological preparations, due to altered peptide structures that cannot be destroyed by proteases. However, *in vivo* inactivation of synthetic surfactant by inflammatory mediators has not been tested in a clinical relevant model of chorioamnionitis-induced preterm birth.

Ventilation-induced lung injury:

2. Is inhibition of pulmonary developmental pathways by a novel phosphodiesterase inhibitor effective in reducing bronchpulmonary dysplasia caused by chorioamnionitis and mechanical ventilation?

Global hypoxia-ischemia:

Is cell-based therapy effective in reducing injury of the preterm brain caused by asphyxia?

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.

Intra-uterine inflammation:

Time-mated Texel ewes receive an intra-amniotic injection of *Ureaplasma Parvum* (UP). UP is the most clinically relevant pathogen with respect to chorioamnionitis (35). Seven days after inoculation with UP the fetus is delivered preterm and subjected to mechanical ventilation and is subsequently treated with different surfactant preparations. The primary outcome of this study is oxygenation. Secondary outcomes of this study are lung compliance, lung injury, and survival.

Ventilation-induced lung injury

In order to model chronic lung disease, we combine intrauterine inflammation and postnatal mechanical ventilation, which are major contributors to BPD in preterms (15, 16). Time-mated Texel ewes receive an intra-amniotic injection of UP. Seven days after inoculation with UP the fetus is delivered preterm and subjected to long-term mechanical ventilation and subsequent treatment with a phosphodiesterase inhibitor.

Pulmonary development are comparable between both sheep and humans in terms that alveolarization

starts in late gestation in both species, allowing for preterm birth and subsequent mechanical ventilation. This model was validated in previous experiments in which feasibility of mechanical ventilation with respect to gestational age was tested.

Primary outcome of this study is survival. Secondary outcomes are lung inflammation, lung compliance, and lung injury.

Global hypoxia-ischemia

Preterm ovine fetuses are chronically instrumented and subsequently subjected to *in utero* hypoxia-ischemia and intravenous administration of cell-based therapeutics at predetermined time-points. The gestational age of the fetus at occlusion is determined previously and correlated to the gestational age at which human fetuses are most vulnerable to brain injury caused by pre- and perinatal adverse events (figure 1) (36).

The primary outcome of this study is structural and functional brain injury. Secondary outcomes are brain inflammation, immune modulation, and function and injury of lungs and gastro-intestinal tract.

We have chosen Texel sheep for the following reasons:

1. In the current proposal, all lambs are born preterm through surgical delivery (Caesarean section), thereby, avoiding the risk of spontaneous labor. Therefore, parturition is not the focus of the experiments.
2. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.

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.

Survival and adult health start *in utero* with a successful transition from *in utero* life to postnatal life. Our program comprises different complications in this transition. The coherence between the different components of our project lies in the fact that we focus on the biggest threats for impaired development in prematurity, infection (i.e. chorioamnionitis), hypoxia-ischemia (i.e. asphyxia), and iatrogenic stressors (i.e. mechanical ventilation). The objective of this project is to develop therapeutic strategies to reduce the consequences of these threats and improve outcome in preterm infants.

The second point of coherence between the different components in this project is inflammation; chorioamnionitis, hypoxia-ischemia, and mechanical ventilation all induce a detrimental inflammatory response in the brain and lungs. Therefore, we select therapeutics with high anti-inflammatory potential.

AIM 1: Identifying a surfactant replacement therapy resistant to inactivation by inflammation/infection would mean a pivotal milestone in neonatal medicine solving a problem which neonatologists face on a daily basis. The end of the experiment for aim 1 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go or no go: if synthetic surfactant does not prove to be superior over natural surfactants, we will not pursue further experimentation with this surfactant.

AIM 2: Reducing BPD using a synthetic anti-inflammatory drug would be a significant milestone in

neonatal medicine creating the opportunity to reduce the pulmonary and neurodevelopmental sequelae of BPD in preterm infants. The end of the experiment for aim 1 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go or no go: proof of principle that PDE4 attenuates inflammation- and ventilation-induced lung injury will be a major milestone and will serve as the basis for further experimentation and future clinical trials.

In the model of HI we seek to improve structural and functional brain injury with cell-based therapy (**AIM 3**). Previous studies of our group have indicated that cerebral and peripheral inflammatory responses play a crucial role in the etiology of hypoxic-ischemic brain injury. However the temporal dynamics of these responses require further elucidation (**AIM 3a**). AIM 3a will be a milestone in the understanding of the dynamics of HI brain injury, and will provide more insight into timepoints at which cell-based therapies should be administered.

The spleen is considered a key immunological organ contributing to brain injury by providing immune effector cells that invade the brain. We therefore postulate that cell-based interventions should modulate this splenic inflammatory response. Splenectomy will enable us to study the contribution of the splenic inflammatory response in the etiology of hypoxic-ischemic brain injury, which would be a milestone in understanding the pathophysiology (**AIM 3b**). Moreover, we will compare the effects of splenectomy to administration of Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC), as subset of mesenchymal stromal cells that have previously been shown to modulate neuroinflammation through interactions with splenic immune cells in adults. AIM3b will be a milestone a milestone and a go or no go. If the splenic involvement cannot be demonstrated in our study, we will pursue other targets (need to be determined on the basis of the experiment), but we will not continue targeting the spleen with cell-based therapies.

We will test clinical-grade stem cells or biological preparations derived from these cells (e.g. microvesicles and preconditioned cells) for their effectiveness in reducing in the preterm brain after asphyxia (**AIM 3c**). AIM 3c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM 3B. However, if cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.

Improving functional and structural outcome of the preterm brain after asphyxia is a huge milestone in neonatal medicine creating a chance to improve the neurodevelopmental outcome of many preterms. Subsequently optimal dosing strategy (**AIM 3d**) and long-term treatment effects (**AIM 3e**) will be determined.

Go or no go's and milestones

AIM 1:

The end of the experiment for aim 1 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go or no go: if synthetic surfactant does not prove to be superior over natural surfactants, we will not pursue further experimentation with this surfactant.

AIM 2:

The end of the experiment for aim 2 will serve as a milestone (proof of principle) and as a go or no go: proof of principle that PDE4 attenuates inflammation- and ventilation-induced lung injury will be a major milestone and will serve as the basis for further experimentation and future clinical trials.

AIM 3:

AIM 3a will be a milestone in the understanding of the dynamics of HI brain injury, and will provide more insight into time points at which cell-based therapies should be administered.

AIM 3b will be a milestone and a go or no go. If the splenic involvement cannot be demonstrated in our study, we will pursue other targets (need to be determined on the basis of the experiment), but we will not continue targeting the spleen with cell-based therapies.

AIM 3c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM 3B. However, if cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.

AIM 3d will be a milestone in determining the optimal dosing strategy that will be tested for long term effects in **AIM 3e**.

If our cell-based therapy has long-term effectiveness (**AIM 3e**), this will be a major milestone for future experiments and clinical trials.

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	Intra-uterine inflammation
2	Ventilation-induced lung injury
3	Global hypoxia-ischemia
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

Proposal

- [1] Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.
- [2] Saigal S, Doyle LW. An overview of mortality and sequelae of preterm birth from infancy to adulthood. *Lancet*. 2008;371(9608):261-9.
- [3] Doyle LW, Faber B, Callanan C, Freezer N, Ford GW, Davis NM. Bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight subjects and lung function in late adolescence. *Pediatrics*. 2006;118(1):108-13.
- [4] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *The New England journal of medicine*. 2000;342(20):1500-7.
- [5] Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med*. 2000;342(20):1500-7.
- [6] Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al. New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One*. 2012;7(10):e47631.
- [7] Sato A, Ikegami M. SP-B and SP-C containing new synthetic surfactant for treatment of extremely immature lamb lung. *PLoS One*. 2012;7(7):e39392.
- [8] Kallapur SG, Jobe AH. Contribution of inflammation to lung injury and development. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91(2):F132-5.
- [9] Watterberg KL, Demers LM, Scott SM, Murphy S. Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. *Pediatrics*. 1996;97(2):210-5.
- [10] Burri PH. Structural aspects of postnatal lung development - alveolar formation and growth. *Biol Neonate*. 2006;89(4):313-22.
- [11] Bancalari E, Claure N, Sosenko IR. Bronchopulmonary dysplasia: changes in pathogenesis, epidemiology and definition. *Semin Neonatol*. 2003;8(1):63-71.
- [12] Farstad T, Bratlid D, Medbo S, Markestad T. Bronchopulmonary dysplasia - prevalence, severity and predictive factors in a national cohort of extremely premature infants. *Acta Paediatr*. 2011;100(1):53-8.
- [13] Kobaly K, Schluchter M, Minich N, Friedman H, Taylor HG, Wilson-Costello D, et al. Outcomes of extremely low birth weight (<1 kg) and extremely low gestational age (<28 weeks) infants

- with bronchopulmonary dysplasia: effects of practice changes in 2000 to 2003. *Pediatrics*. 2008;121(1):73-81.
- [14] Short EJ, Klein NK, Lewis BA, Fulton S, Eisengart S, Kercksmar C, et al. Cognitive and academic consequences of bronchopulmonary dysplasia and very low birth weight: 8-year-old outcomes. *Pediatrics*. 2003;112(5):e359.
- [15] Kinsella JP, Greenough A, Abman SH. Bronchopulmonary dysplasia. *Lancet*. 2006;367(9520):1421-31.
- [16] Speer CP. Chorioamnionitis, postnatal factors and proinflammatory response in the pathogenetic sequence of bronchopulmonary dysplasia. *Neonatology*. 2009;95(4):353-61.
- [17] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Kramer BW. Thrown off balance: the effect of antenatal inflammation on the developing lung and immune system. *Am J Obstet Gynecol*. 2013;208(6):429-37.
- [18] Kunzmann S, Collins JJ, Kuypers E, Gavilanes AW, Kramer BW. [Effects of antenatal inflammation on the developing lung]. *Z Geburtshilfe Neonatol*. 2012;216(4):177-85.
- [19] Soto FJ, Hanania NA. Selective phosphodiesterase-4 inhibitors in chronic obstructive lung disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(2):129-34.
- [20] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani el H, Steendijk P, Middeldorp M, van der Laarse A, et al. Phosphodiesterase 4 inhibition attenuates persistent heart and lung injury by neonatal hyperoxia in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;302(1):L56-67.
- [21] de Visser YP, Walther FJ, Laghmani EH, van Wijngaarden S, Nieuwland K, Wagenaar GT. Phosphodiesterase-4 inhibition attenuates pulmonary inflammation in neonatal lung injury. *Eur Respir J*. 2008;31(3):633-44.
- [22] Mehats C, Franco-Montoya ML, Boucherat O, Lopez E, Schmitz T, Zana E, et al. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on alveolarization and hyperoxia toxicity in newborn rats. *PLoS One*. 2008;3(10):e3445.
- [23] Mehats C, Bourbon J, Jarreau PH. Does PDE4 inhibition improve alveolarisation in hyperoxia-exposed immature rodents? *Eur Respir J*. 2009;33(5):1236; author reply 7.
- [24] Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2011(204):85-119.

- [25] Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O'Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res.* 2010;11:26.
- [26] Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL. Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2013;26(5):588-95.
- [27] Gortner L, Felderhoff-Muser U, Monz D, Bieback K, Kluter H, Jellema R, et al. Regenerative therapies in neonatology: clinical perspectives. *Klin Padiatr.* 2012;224(4):233-40.
- [28] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566-73.
- [29] Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(5):383-96.
- [30] Jellema RK, Wolfs TG, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, Kuypers E, et al. Mesenchymal stem cells induce T-cell tolerance and protect the preterm brain after global hypoxia-ischemia. *PLoS One.* 2013;8(8):e73031.
- [31] Jellema RK, Lima Passos V, Ophelders DR, Wolfs TG, Zwanenburg A, De Munter S, et al. Systemic G-CSF attenuates cerebral inflammation and hypomyelination but does not reduce seizure burden in preterm sheep exposed to global hypoxia-ischemia. *Exp Neurol.* 2013;250:293-303.
- [32] Jellema RK, Lima Passos V, Zwanenburg A, Ophelders DR, De Munter S, Vanderlocht J, et al. Cerebral inflammation and mobilization of the peripheral immune system following global hypoxia-ischemia in preterm sheep. *J Neuroinflammation.* 2013;10:13.
- [33] Berseth CL, McCoy HH. Birth asphyxia alters neonatal intestinal motility in term neonates. *Pediatrics.* 1992;90(5):669-73.
- [34] Fox TP, Godavitarne C. What really causes necrotising enterocolitis? *ISRN gastroenterology.* 2012;2012.
- [35] Berger A, Witt A, Haiden N, Kretzer V, Heinze G, Kohlhauser C. Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short-term outcome of preterm infants. *J Perinat Med.* 2003;31(2):115-21.
- [36] Back SA, Riddle A, Dean J, Hohimer AR. The instrumented fetal sheep as a model of cerebral white matter injury in the premature infant. *Neurotherapeutics.* 2012;9(2):359-70.

Appendix 1

- [1] Seehase M, Collins JJ, Kuypers E, Jellema RK, Ophelders DR, Ospina OL, et al. New surfactant with SP-B and C analogs gives survival benefit after inactivation in preterm lambs. *PLoS One*. 2012;7:e47631.
- [2] Nitsos I, Moss TJ, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9:80-5.

Appendix 2

- [1] Albertine KH. Utility of large-animal models of BPD: chronically ventilated preterm lambs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2015;308:L983-L1001.
- [2] Tenor H, Hatzelmann A, Beume R, Lahu G, Zech K, Bethke TD. Pharmacology, clinical efficacy, and tolerability of phosphodiesterase-4 inhibitors: impact of human pharmacokinetics. *Handb Exp Pharmacol*. 2011:85-119.
- [3] Tralau-Stewart CJ, Williamson RA, Nials AT, Gascoigne M, Dawson J, Hart GJ, et al. GSK256066, an exceptionally high-affinity and selective inhibitor of phosphodiesterase 4 suitable for administration by inhalation: in vitro, kinetic, and in vivo characterization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337:145-54.
- [4] Nials AT, Tralau-Stewart CJ, Gascoigne MH, Ball DI, Ranshaw LE, Knowles RG. In vivo characterization of GSK256066, a high-affinity inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2011;337:137-44.
- [5] Singh D, Petavy F, Macdonald AJ, Lazaar AL, O'Connor BJ. The inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 reduces allergen challenge responses in asthma. *Respir Res*. 2010;11:26.
- [6] Watz H, Mistry SJ, Lazaar AL. Safety and tolerability of the inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor GSK256066 in moderate COPD. *Pulm Pharmacol Ther*. 2013;26:588-95.
- [7] Nitsos I, Moss TJ, Cock ML, Harding R, Newnham JP. Fetal responses to intra-amniotic endotoxin in sheep. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 2002;9:80-5.
- [8] Shorten PR, O'Connell AR, Demmers KJ, Edwards SJ, Cullen NG, Juengel JL. Effect of age, weight, and sire on embryo and fetal survival in sheep. *J Anim Sci*. 2013;91:4641-53.



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Therapeutische maatregelen om de uitkomst van vroeggeboren (premature) kinderen te verbeteren.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Vroeggeboorte, hersenschade, longschade, therapie

2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel 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)	Gezondheid op volwassen leeftijd start bij de ontwikkeling van de baby in de baarmoeder. Het is dus begrijpelijk dat als de ontwikkeling wordt onderbroken door vroeggeboorte, dit een grote invloed kan hebben op de gezondheid op latere leeftijd. Vroeggeboorte kan niet altijd voorkomen worden en soms is het zelfs beter voor de baby om geboren te worden omdat de situatie in de baarmoeder de gezondheid van de baby ernstig in gevaar brengt. Deze baby's hebben speciale zorg nodig die de ontwikkeling van deze
---	---

zeer kwetsbare groep patiënten ondersteunt. Dankzij deze goede zorg is de overlevingskans van deze kinderen sterk gegroeid, maar nog altijd gaat vroeggeboorte vaak gepaard met complicaties (op de lange termijn), zoals longproblemen en hersenschade. Om deze schade te beperken zullen nieuwe therapieën en aanpassingen van reeds bestaande therapieën getest moeten worden alvorens deze in de kliniek kunnen worden toegepast. Het doel van dit project is derhalve om nieuwe therapieën te ontwikkelen om de gevolgen van hersen- en longschade bij vroeggeboorte te verminderen.

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

Wetenschappelijk belang:

Dit onderzoek levert inzichten op over nieuwe therapeutische strategieën ter behandeling van schade aan organen na vroeggeboorte.

Maatschappelijk belang:

Het verminderen van hersen- en longschade rondom vroeggeboorte is van groot maatschappelijk belang, omdat hier mee een grote last op patiënten, de ouders van patiënten en de maatschappij wordt verminderd.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Volwassen en foetale schapen

Aantallen: 516 volwassen en 516 foetale schapen

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

De schapen zullen een medische ingreep aan de uterus ondergaan die kan leiden tot wondpijn. Ook zal een deel van de oöien gedurende het experiment fysiek afgezonderd staan in een individueel hok. Hierdoor wordt de bewegingsvrijheid beperkt en is sociaal gedrag met soortgenoten niet mogelijk.

Een deel van de foetussen zal een chirurgische ingreep met inhechten van electrodes en catheters ondergaan, hetgeen het welzijn van de foetus kan beïnvloeden. Echter, tijdens de zwangerschap is het bewustzijnsniveau van de foetus gering, waardoor eventueel ongerief niet als zodanig door de foetus wordt ervaren. Ook worden de foetussen na vroeggeboorte kunstmatig in leven gehouden. Dit kan leiden tot pijn en benauwdheid. Door adequate pijnstilling en kunstmatige slaap worden deze negatieve gevolgen voor het welzijn beperkt.

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

Oöi: 20% matig (zonder chirurgische ingreep); 80% ernstig (met chirurgische ingreep)

Foetus: 80% ernstig; 20% non-recovery (end point van proof al bereikt met

verzamelen van monsters)

- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? Zowel de ooi als de foetus zullen na afloop van het experiment worden gedood waarna de effecten van de nieuwe therapieën op de long- en hersenschade uitgebreid geanalyseerd zullen worden.

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.
- Onderzoek door middel van analyse van verzamelde gegevens en weefsels van patiënten, aangevuld met data uit reeds uitgevoerde dierexperimenten en laboratoriumexperimenten hebben geleid tot een selectie van therapieën die geschikt zijn voor verantwoorde preklinische studies die de situatie in de mens zoveel mogelijk benaderen. Het ontstaan van complicaties veroorzaakt door vroeggeboorte is namelijk een complexe samenhang van verschillende orgaansystemen (o.a. centrale zenuwstelsel en het immuunsysteem) waarvoor geen proefdiervrije alternatieven beschikbaar zijn.
- 4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.
- Goede statistische onderbouwde studies die gebaseerd zijn op voorgaande experimenten en een gefaseerde uitvoering waarin de experimenten logisch op elkaar aansluiten, gekoppeld aan jarenlange ervaring van een gespecialiseerd onderzoeksteam, staan garant voor een wetenschappelijk verantwoorde studie met een minimum aan schapen en een minimum aan ongerief.
- 4.3 **Verfijning**
Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.
- De ontwikkeling van een schaap in de baarmoeder is zeer vergelijkbaar met de ontwikkeling van de mens. Bovendien maakt de lange draagtijd en de grootte van de ooi en de foetus het mogelijk om complexe processen in een compleet organisme tijdens en na de zwangerschap te bestuderen.
- Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.
- Alle dieren (ooi en foetus) krijgen adequate verdoving, pijnstilling en antibiotica om ongerief te voorkomen/beperken(?). Bovendien zullen de dieren zo lang mogelijk in hun natuurlijke omgeving gehouden worden om eventuele stress en angst te verminderen. Alle schapen zullen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|----------------------------|
| 1 | Intra-uterine inflammation |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of Ureaplasma Parvum (UP), since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for 24 hours during which they are treated with different surfactant preparations. We have formulated the following 4 experimental groups:

1. UP + Control
2. UP + Curosurf (clinical standard, porcine origin)
3. UP + CHF 5633 (novel synthetic surfactant)
4. UP + Surfaxin (approved synthetic surfactant)

Within these experimental groups the following primary and outcome parameters will be assessed:

Primary outcomes:

- Oxygenation (arterial oxygen partial pressure) in the course of ventilation: oxygenation is the main clinical parameter indicative for adequate ventilation)
- Repetitive dosing: depending on oxygenation: due to inactivation of surfactant, oxygenation might fail and additional boluses of surfactant are needed.

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.
2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

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

Time-mated Texel ewes will receive an intra-amniotic injection of Ureaplasma Parvum (UP):

Under sedation UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays. **Maternal administration should not be confused with postnatal steroid treatment in the fetus for BPD. Postnatal treatment has serious side effects on the neurodevelopmental outcome. Therefore, we are looking at two different treatments: one PRENATALLY to the pregnant woman which is beneficial, one POSTNATALLY to the preterm baby which has side effects.**

Administration of corticosteroids for longer periods of time induces abortion in sheep. However, a single injection of dexamethasone, as administered in our proposed experiments, will not increase the risk of abortion provided that the fetus will be born 48 hours after injection.

Previous experiments with intra-uterine Ureaplasma Parvum infection and treatment with dexamethasone demonstrated that dexamethasone 2 days prior to delivery did not have any effects on the immune response towards Ureaplasma Parvum

Seven days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. **anesthesia**) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive **surfactant replacement therapy** (according to their allocation). The lamb remains mechanically ventilated for 24 hours while **anesthesia** is maintained. Surfactant replacement therapy is repeated throughout the experiment if necessary.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into

account to minimise the number of animals.

We have a preference for singleton pregnancies since this is more clinically relevant and twins can strongly affect each other's health (i.e. resulting in small for gestational age) however, to reduce the number of pregnant ewes we can use both singleton and twin pregnancies. Furthermore, we do not know in advance whether it will be a single or twin pregnancy and only selecting twin pregnancies will result in massive over-breeding. Group numbers were determined with the power-calculation according to Sachs, in which variance and expected therapeutic effects are based on previous experiments with surfactant in non-infectious sheep models.

We have successfully used group numbers of 8-12 animals for evaluations of postnatal lung maturation and surfactant metabolism

In ventilated preterm sheep (non-infectious model, Seehase et al., 2012) CHF5633 has shown a comparable effect on oxygenation but superior resistance against inactivation. Surfactant re-dosing in a 24-hour period of ventilation is the critical outcome in this experiment.

Based on the *in vivo* data the expected treatment effect is 30%, with a spread of 40% (Seehase et al., 2012).

With a power of (π) 80% and alpha 0.05, significant differences in number of surfactant re-dosing of 30% ($\delta=30$) with a SD of 40% ($\sigma=40$) can be detected with a sample size of **9** ($n = 15.7 * (30/40)^2 = 8.83$).

Loss of animals (reaching human endpoints, intra-uterine inflammation) for inclusion in the experiments and experimentation are considered to be 25%. Therefore we will add 3 animals, making the total number of animals per experimental group **12** ($a - 0.25a = 9$; $.075a = 9$; $a = 12$).

The total number of animals needed for the current study will be 4 groups * 12 animals = **48** animals. We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

B. The animals

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

This experiment will be performed with a maximum of 48 pregnant sheep (Texel breed) and their respective singleton or twin fetuses (> 2/3 gestation, max. 48 fetuses) that are randomly allocated into 4 experimental groups consisting of 3 different surfactant replacement therapies and a control group. If there are twin pregnancies less pregnant ewes will be needed. The gestational age at which the lambs are delivered (132d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 1). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield

animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

We have chosen Texel sheep for the following reasons:

1. In the current proposal, all lambs are born preterm through surgical delivery (Caesarean section), thereby, avoiding the risk of spontaneous labor. Therefore, parturition is not the focus of the experiments.
2. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.

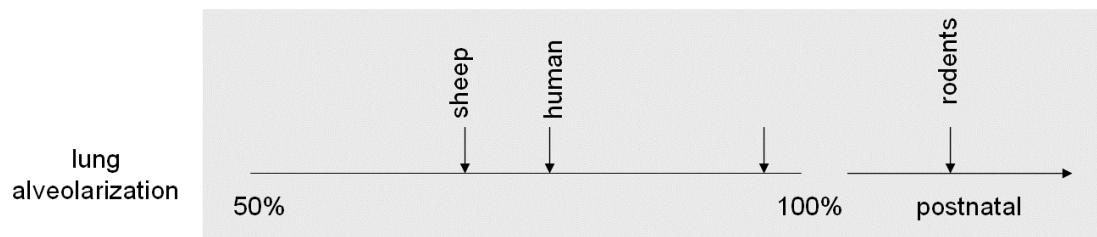


Figure 1 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

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: For this experiment in which different surfactant preparations are tested, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar. For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice.

Moreover, the use of preterm lambs has been suggested by the European Medical Agency (EMA) to pharmaceutical companies. We have done studies with synthetic surfactant (Seehase et al., 2012) which were mandated by the EMA in order to show in vivo the safety and feasibility of the new drug. It is unacceptable to test directly in human babies based on exclusively in vitro data by the standards of EMA and by good clinical practice since preterm babies is the most vulnerable patient population. In addition neonatology is full of examples of premature clinical trials with caused harm in the study population (e.g. phospholipid treatment for RDS).

Reduction: Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data (also on CHF 5633 inactivation (2)) and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes.

Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used. We rely on natural breeding. Therefore, we cannot control for singleton or twin pregnancies.

Refinement: Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact. Moreover, the fetus will receive analgesia and nutritional support (glucose) during mechanical ventilation.

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

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep are housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the humane endpoint section. Post-operative (after intra-amniotic injection) antibiotics, if necessary, will be administered, in order to prevent progression of (wound) infection.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

Fetus

Previous experiments have demonstrated that fetal cortisol levels do not change in the course of chorioamnionitis (3). This suggests that the fetus will experience limited discomfort during intra-uterine

inflammation in our experiments.

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The use of **synthetic surfactant** has been tested, and proven superior compared to biological surfactant preparations, in non-infectious models of prematurity (ovine models) in which surfactant inactivation was established by administration of exogenous compounds. However, clinically, surfactant is inactivated by due to the **endogenous** production of inflammatory mediators that arise from chorioamnionitis and/or a subsequent infection. Previously, we have used lipopolysaccharide as 'inflammatory trigger'. Despite its proinflammatory potential, it does not cause **chronic inflammation** which persists **postnatally** and can influence ventilation and oxygenation. Moreover, UP is most commonly associated with chorioamnionitis.

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

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.

Ewe: induction of anesthesia through thiopental i.v., continuation with isoflurane 1-2% and remifentanyl i.v. Local analgesia of surgical wounds with lidocaine.

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed with ketamine and midazolam i.v.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep. This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia) or hypoglycemia.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes. The fetus might experience pain, suffer from hemodynamic instability or respiratory complications (pneumothorax, hypoxia).

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will be euthanized immediately after delivery of the fetus to minimise post-operative pain and complications.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia. Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus. Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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.

Humane endpoints for ewes:

- Pending preterm labor

- Intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at the site of intra-amniotic injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
 - o **Systemic:** Elevation of the body-temperature, elevation of the heart-rate, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)

Humane endpoints for fetus:

- Untreatable pneumothorax
- Uncorrectable severe respiratory acidosis
- Sepsis Uncorrectable hypovolemia
- Multi-organ failure

Indicate the likely incidence.

Ewe: 5%

Fetus: 10%

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').

Ewe: Moderate

Lamb: Non-recovery. During the mechanical ventilation, the lambs are continuously anesthetized (sedation and analgesia), and will not regain conscience, until the end of the experiment (euthanasia). Therefore, we consider the classification of the experiment to be non-recovery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The ewe will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection an abdominal surgery.

The lamb will be euthanized since vital organs (i.e. lungs) have to be sampled for biochemical analysis.

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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---------------------------------|
| 2 | Ventilation-induced lung injury |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

We induce intra-uterine inflammation with intra-amniotic injections of *Ureaplasma Parvum*, since this micro-organism is the most commonly found micro-organism in human chorioamnionitis cases. Previous studies already validated this approach and the same amount of colony forming units will be administered in the current study. The presence of chorioamnionitis can only be confirmed after birth which will be done by histological examination of the fetal membranes and placenta. The fetuses are delivered preterm by C-section, sedated and mechanically ventilated for a maximum of 8 days since we previously showed that a minimum of 8 days of mechanical ventilation is necessary to develop (histological) BPD [1]. During mechanical ventilation the lambs are treated with a PDE4 inhibitor. The following primary and secondary outcome parameters will assess feasibility, safety and efficacy of a topical administered PDE4 inhibitor:

Primary outcome parameters:

1. Survival. Both intrauterine inflammation and preterm birth are major risk factors for neonatal death due to complications that arise from underdeveloped organ systems. Treatment might improve survival compared to controls.

Secondary outcome parameters:

2. Lung inflammation, lung compliance, and lung injury

Lambs are the most appropriate animals to address our hypothesis, for a number of reasons:

1. Development of the lungs in sheep has been sufficiently studied to allow informed experimental design and integration of findings with those from previous studies. The current surfactant replacement therapy was developed in preterm lambs.
2. Preterm lambs are large enough to use similar equipment for ventilation as in the neonatal intensive care unit, provide sufficient blood and tissue to allow enough biomolecular analyses, for thorough assessment of the biological systems being investigated, in individuals.

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

Under sedation UP is administered by ultrasound-guided intra-amniotic injection. 2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally. Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays.

Seven days after the inoculation with UP, the fetus will be born preterm by **C-section** (general anesthesia): while remaining on placental circulation umbilical vessel catheters are placed for administration of medication (i.e. anesthesia) and blood gas analysis and an endotracheal tube is placed for ventilatory support (modified EXIT procedure). The lamb is immediately placed in our lamb intensive care unit which resembles the clinical intensive care very closely. Before connection to mechanical ventilation the lambs receive surfactant replacement therapy which is repeated if necessary (based on oxygenation). The lambs remain under ventilatory support for 8 days while **anesthesia** is maintained. During these days, repetitive doses of iPDE4 or sham treatment will be administered endotracheally.

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

We have successfully used group numbers of 6-8 animals for evaluations of structural changes in elastin deposition in the fetal lung (Kuypers et al., 2012; Collins et al., 2013).

Based on these data, with a power (n) of 80% and an alpha of 0.05, significant different structural changes between the control and experimental group of 20% ($\delta=20$) with a Standard deviation of 15% ($\sigma=15$) can be detected with a sample size of 9 ($n = 15.7 * (15/20)^2 = 8.83$ (L. Sachs))

We take into account a loss of 25% of the animals due to complications of intra-uterine inflammation, premature birth and human endpoints. Therefore the total number of animals per experimental groups will be 12 (a - 025a = 9; .075a = 9; a = 12). The total number of animals needed for the current study will be 4 groups * 12 animals = 48 animals. We cannot predict the number of twin pregnancies, since multiple factors (e.g. seasonal vs. out of season breeding and the age of the ewe) are of influence. Therefore, the number of ewes is based on singleton pregnancies. In the case of twin pregnancy, the total number of ewes used for the experiment will be reduced.

B. The animals

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

This experiment will be performed with a maximum of **48** pregnant sheep (Texel breed) and their respective singleton fetuses (> 2/3 gestation), that are randomly allocated to their respective treatment group (figure 1).

The gestational age at which the lambs are delivered (127d gestational age) is based on the developmental biology in which the sheep is very similar to a preterm infant (figure 2). In contrast to rodents, ovine lung development (alveolarization) starts prenatally and is prolonged postnatally. Moreover, the size allows for usage of similar equipment and ventilation strategies as is currently used in clinical practice. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

We have chosen Texel sheep for the following reasons:

1. In the current proposal, all lambs are born preterm through surgical delivery (Caesarean section), thereby, avoiding the risk of spontaneous labor. Therefore, parturition is not the focus of the experiments.
2. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.



Figure 1 [REDACTED]

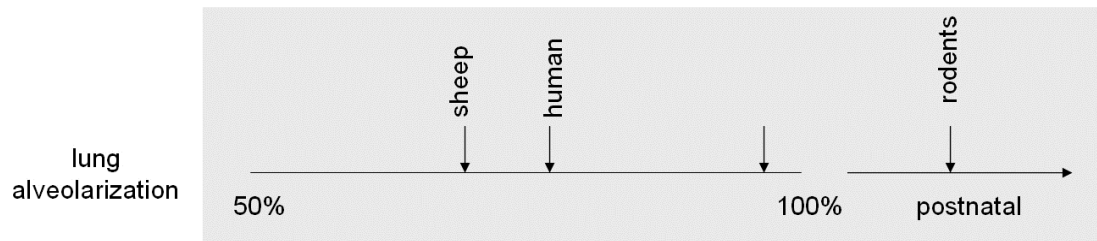


Figure 2 Time-points are shown when lung alveolarization, an important hallmark of lung maturation, occurs in different species. Lung maturation in sheep occurs prenatally, as in humans. Lung maturation in rodents takes place after birth.

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: For this innovative technique of PDE4 inhibitor administration, the choice of animal model is based on the body size, use of similar equipment as in the neonatal intensive care and the developmental biology. In contrast to rodents, ovine and human the developmental biology are very similar (figure 2). For example, the alveolar phase in lambs and humans starts before birth in a hypoxic environment, compared to rodents in which the alveolarization starts postnatally in normoxic conditions. Therefore, we have established an animal model of immature lung-development in preterm lambs. Findings in our animal model can be easily translated into clinical practice.

Reduction: Due to large experience with sheep and maintenance of lambs on the lamb intensive care unit we are able to increase the number of animals that successfully reach the end of their experiments. Due to the expertise and experience of our team we have low numbers of drop-outs, which reduces the numbers of animals in the experimental groups. Our experiments are conducted by highly experienced personnel according to well-established protocols. These methods are in favor of reproducibility and use of previously obtained historical data and prevent unnecessary use and loss of animals. Moreover, we do not differentiate between genders since our clinical population consists of both sexes. Furthermore, we are able to incorporate twin pregnancies in our study. This results in a reduction of pregnant ewes that will be used.

A variety of inhalable PDE4 inhibitors have been tested in vitro and in vivo (adult models of asthma and COPD), from which GSK256066 yielded the most promising results [2-6]. Therefore, we will only test

GSK256066 in our current model at dosages defined on this pre-existing data.

Refinement: Our experiments will be conducted by a highly trained staff that can recognize and prevent discomfort. Moreover, we aim to leave the sheep as much in their natural environment (group housing in a meadow) as we can with minimal human contact.

Based on previous experiments [1], we have defined that a minimum of 8 days of postnatal ventilation is necessary to result in a phenotype similar to BPD. Moreover, the fetus will receive nutritional support (glucose) and analgesia will be given during mechanical ventilation (**anesthesia**)

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

Ewe

Before induction of intra-uterine inflammation and the C-section the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. After induction of intra-uterine inflammation the sheep will be housed in groups with access to food and water *ad libitum*.

The sheep will be checked daily for discomfort due to intra-uterine inflammation. Discomfort due to intra-uterine inflammation is described in the human endpoint section. If necessary, analgesics are administered to treat pain.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

Fetus

During intrauterine inflammation fetuses will not experience distress as demonstrated by no changes of fetal cortisol levels during chorioamnionitis [7].

Chorioamnionitis is a multi-organ disease resulting in discomfort after birth, as they need to survive independently and start using their immature and inflammation affected organs. However, after C-section (birth) the fetus will stay on the Lamb Intensive Care Unit (LICU) and taken care of by highly trained personnel. During mechanical ventilation the fetus is constantly sedated (also receiving analgesia and parenteral feeding) with continuous monitoring and interpretation of vital parameters. Moreover, the environment in the LICU (temperature, light, sound) will be kept optimal in order to reduce discomfort.

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.

Induction of intra-uterine inflammation in pregnant sheep with *Ureaplasma Parvum* is an existing model. However, this model has not been used thus far for pre-clinical testing of topical administration of iPDE4. Moreover, for the first time a combination of different factors including antenatal and postnatal hits (intra-uterine inflammation, mechanical ventilation; hyperoxia) is used to induce lung injury. These conditions are all new and therefore do not entail repetition of experiments. State of the art therapy

standards are also included in the study design which better reflects the human clinical situation and makes translation easier.

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

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.

Ewe: induction of anesthesia through thiopental i.v., continuation with isoflurane 1-2% and remifentanil i.v. Local analgesia of surgical wounds with lidocaine.

Lamb: whilst on placental circulation, the lamb is sedated through anesthesia of the ewe. Ex utero experiments are performed with ketamine and midazolam i.v.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Ewe:

Abortion might occur due to chorioamnionitis, but is very uncommon in sheep [8]. This is a major reason to use this species.

Fetus:

The fetus will be sedated continuously after birth to minimise discomfort, also receiving analgesia.

Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus.

Explain why these effects may emerge.

Due to their immaturity preterm fetuses are not always able to respond properly to environmental changes.

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

Ewe:

All invasive procedures are performed under aseptic conditions.

The ewe will be euthanized immediately after delivery of the fetus to minimise post-operative pain and complications.

Fetus:

Environmental conditions (light, temperature, sounds) on the LICU are all in favour of the fetus. Pain will be prevented by continuous anesthesia. Continuous monitoring of hemodynamic and respiratory enables us to treat or prevent the complications. Intravenous administration of glucose will prevent hypoglycemia (regularly checked)

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.

Humane endpoints for ewes:

- Pending preterm labor
- Abortion caused by intra-uterine fetal death
- Sepsis/ infection not responding to treatment
 - o **Local (at site of injection):** redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
 - o **Systemic:** Elevation of the body-temperature, elevation of the heart-rate, lethargy, excessive time lying down
- Untreatable pain: (a sheep that does not respond to analgesic treatment)
 - o **Assessment of pain:**
 - Lack of appetite
 - Grinding of teeth
 - Reluctance to stand/ excessive time lying down
 - Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort

Humane endpoints for lambs:

- Untreatable pneumothorax (absence of breath sounds)
 - Uncorrectable severe respiratory acidosis(based on blood gas analysis)
 - Sepsis (elevation of body temperature, elevation heart rate, blood gas analysis)
 - Uncorrectable hypovolemia (blood pressure, heart rate, blood gas analysis)
- Multi-organ failure (blood-pressure, heart rate, blood gas analysis)

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

10% based on previous experiments. Chorioamnionitis and/or preterm birth are major risk factors for fetal death, regardless of treatment. Therefore, sham-treated animals might die during the experiments

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The fetus will be euthanized at the end of the experiment since examination of organ tissues is crucial to determine the effects of our treatment(s).

The ewes will be euthanized since we cannot reuse her for other purposes due to an intra-uterine infection an abdominal surgery.

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.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--------------------------|
| 3 | Global hypoxia-ischemia |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Ovine fetuses will be chronically instrumented. After a four day recovery period the fetuses are subjected to 25 minutes of (sham) umbilical cord occlusion. After occlusion the fetus will receive an intravenous bolus of cell-based therapy. During the entire experiment electrophysiological and hemodynamic recordings are made continuously.

We have formulated the following experiments and experimental designs:

Table 1 Experimental groups

Aim	Nr. groups	sham/HI	Experimental condition	Cell-based therapy	N	Total N
3a	6	sham	1 day	-	N=12	N=60
			3 days	-	N=12	
			7 days	-	N=6	
		HI	1 day	-	N=12	
			3 days	-	N=12	
			7 days	-	N=6	
3b	8	sham	SPLX	saline	N=12	N=96
				MAPC	N=12	
			Sham SPLX	saline	N=12	

				MAPC	N=12	
		HI	SPLX	saline	N=12	
				MAPC	N=12	
		HI	Sham SPLX	saline	N=12	
				MAPC	N=12	
3c	12	sham	-	saline	N=6	N=108
			-	MSC	N=6	
			-	MSC-EV	N=12	
			-	MAPC	N=6	
			-	MAPC-EV	N=12	
			-	preconditioned	N=12	
		HI	-	saline	N=6	
			-	MSC	N=6	
			-	MSC-EV	N=12	
			-	MAPC	N=6	
-	MAPC-EV	N=12				
-	preconditioned	N=12				
3d	10	sham	saline		N=6	N=108
			Superior therapy	Dose 1, timing 1	N=12	
			Superior therapy	Dose 1, timing 2	N=12	
			Superior therapy	Dose 2, timing 1	N=12	
			Superior therapy	Dose 2, timing 2	N=12	
			saline		N=6	
		HI	Superior therapy	Dose 1, timing 1	N=12	
			Superior therapy	Dose 1, timing 2	N=12	
			Superior therapy	Dose 2, timing 1	N=12	
			Superior therapy	Dose 2, timing 2	N=12	
3e	4	sham	saline		N=12	N=48
			Superior therapy		N=12	
		HI	saline		N=12	
			Superior therapy		N=12	
SPLX = splenectomy						N=420

Primary outcomes:

1. Structural brain injury (determined post-mortem with MRI and immunohistochemistry)
2. Brain function (analysis of electro graphical data)

Secondary outcomes:

1. Brain inflammation
2. Immune activation
3. Function and injury of lungs and gastro-intestinal tract

Ovine fetuses are the most appropriate animals to address our hypotheses for a number of reasons:

1. Ovine neurodevelopment is comparable to human neurodevelopment in terms of white matter myelination; myelination starts prenatal in humans and sheep compared to rodent in which myelination starts postnatally.
2. Preterm lambs (106 days gestational age , ~30 weeks human neurodevelopment) are large enough to perform chronic instrumentations which allow the investigator to perform continuous

measurements in vital parameters throughout gestation.

The long gestational period (~147 days) allows for close investigation of specific developmental processes.

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

Fetuses of time-mated Texel ewes (102 days gestational age) will be **chronically instrumented** under strict sterile conditions: under general anesthesia the fetus will be exposed through a median laparotomy. While remaining on placental circulation an arterial catheter for blood pressure measurements and blood sampling, a venous catheter for administration of therapeutics and ECG electrodes for cardiac monitoring are placed. EEG electrodes are paced on the dura to monitor brain activity and seizures. An inflatable vascular occluder is placed around the umbilical cord to induce transient global hypoxia-ischemia. The fetal spleen is removed in 10-20% (AIM3b) of the animals through a subcostal incision. A gastric tube is placed (oral) for studies of gastro-intestinal absorption and motility. The fetus is placed back in utero and upon closure of the uterus a catheter is placed in the amniotic cavity for pressure recordings. All catheters and leads are exteriorized through a trocar hole in the flank of the ewe.

After a 4 day recovery period the fetuses are subjected to **25 minutes of umbilical cord occlusion** (106 days gestational age) by rapid inflation of the vascular occluder. After occlusion a **reperfusion period** will follow of maximal 30 days while the fetus will remain in utero during which **cell-based therapy** is administered intravenously (maximal 2 repeated dosages). Moreover, arterial blood samples are taken (maximal 1 sample per 48 hours). 24 hours before the end of the experiment rhodamine-labelled dextran is given through the gastric tube for post-mortem evaluations of gastro-intestinal absorption and motility. At the end of the experiment, the ewe and the fetus will be euthanized (intravenous pentobarbital, simultaneously), followed by C-section and tissue sampling for *ex vivo* analysis.

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

In previous experiments on hypoxia-ischemia and cell-based therapies in ovine fetuses we have successfully used group-numbers of 6-8 animals (Jellema et al., 2013a, 2013b, 2013c).

Based on these data, with a power (n) of 80% and an alpha of 0.05, significant different structural changes and functional changes between the control and experimental groups of 30% ($\delta=30$) with a Standard deviation of 40% ($\sigma=40$) can be detected with a sample size of **9** ($n = 15.7 * (30/40)^2 = 8.83$ (L. Sachs))

We take into account a loss of 25% of the animals due to complications of fetal instrumentation and umbilical cord occlusion. Therefore the total number of animals per experimental groups will be **12** ($a - 0.25a = 9$; $.075a = 9$; $a = 12$).

Since some groups will be repeated throughout all aims, we will, if supplementing with historical controls is possible, not repeat these experiments, but limit our animal number to 6. We have to repeat control experiments to be able to correct for differences between breeding seasons (personal communication: differences in outcome parameters were detected between different breeding seasons).

B. The animals

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

This experiment will be performed with a maximum of **420** pregnant sheep and maximally **420** of their respective singleton fetuses (> 2/3 gestation). We have planned 5 individual experiments (AIMS 3a-e) which will follow in logical order and whose implementation is dependent on the results of previous experiments ("milestones"). Group sizes have been calculated with the formula of Sachs in which structural brain injury and brain function (obtained from previous experiments) were primary outcome parameters.

The sheep used in this study are bred by a highly experienced farmer who also breeds for other sheep experiments. Animals will be time-mated to yield animals of the appropriate age. Two antenatal ultrasound scans will ensure correct gestational age and adequate in utero growth.

We have chosen Texel sheep for the following reasons:

1. In the current proposal, all lambs are born preterm through surgical delivery (Caesarean section), thereby, avoiding the risk of spontaneous labor. Therefore, parturition is not the focus of the experiments.
2. Our staff and the staff of the animal care facility have been trained by a Texel sheep breeder to recognize symptoms of pending labor and give assistance to the sheep upon labor. Recognition of pending labor and assistance during labor reduces the risk of complications and improves animal well-being.

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: These animal experiments cannot be performed otherwise since:

1. We aim to mimic the clinic as much as possible in order to make an easy translation towards clinical application.
 2. The pathophysiology of global hypoxia-ischemia involves complex interplay between different organ systems connected to each other by the vascular and nervous system. This interplay cannot be mimicked outside the body.
-

3. We give a systemic therapy which will engage multiple facets of the pathophysiology of global hypoxia-ischemia.

We intend to perform these experiments in sheep since:

1. Ovine prenatal organ development (lung, brain and gut) closely mimics human organ development compared to rodents.
2. The long gestational period of sheep (~147 days) allows for more detailed and better timed studies of developmental processes during gestation compared to rodents.
3. The relative large size of sheep allows for chronic instrumentation and (electro) physiological monitoring of vital clinical relevant functions during gestation.

Reduction:

We strive to minimize the number of animals used in the proposed study as follows:

1. We will complement control groups with historical controls in order to prevent repetition of experiments.
2. Based on the go's and no go's and milestones we will reduce the number of cell-based therapies, and therefore animal numbers, in experiments 4 and 5.
3. The addition of gut-function as an additional functional read-out for our cell-based interventions will prevent the use of additional animals for gut motility and absorption purposes only and reduces the overall number of animals, without increasing discomfort.

Refinement: It is vital that the sheep are housed solitary in a confined space since the catheters and leads that exit the ewe's flank are connected to monitoring equipment and infusion pumps. Solitary housing will prevent that other animals can gnaw through the vascular catheters (personal experience) and cause early termination of the experiment (human endpoint). However, the sheep will be within auditory, visual and olfactory reach of other sheep. Moreover, behavioral observation and cortisol measurements have determined that this type of housing is well tolerated by the sheep and does not induce significant stress.

The stress for sheep has been assessed in different manners like hormone (cortisol), heart rate, breathing rate, blood pressure, behavior and food intake - among which the cortisol level has been relatively reliable as an indicator of stress. Other indicators of stress depend on the time of the day, environment and facilities. Keeping the sheep in groups rather than alone is the most important prevention of stress in this species which is consistently done at the facilities in Maastricht. Stress is in addition a confounding factor in our experiments which we want to avoid at all costs. Given our experience with the models and the expertise in the facility in Maastricht, we are convinced that the stress level is kept to a minimum.

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

Ewe

Before instrumentation-surgery the sheep are kept in their natural environment as long as possible with access to food and water *ad libitum*. During the experiment the sheep will be kept within visual, auditory

and olfactory range of other sheep and will have a normal day-night cycle.

The sheep will be checked daily for discomfort due to surgery and hypoxia-ischemia. Discomfort is described in the humane endpoint section. Post-operative antibiotics and analgesia will be administered in order to prevent (wound) infection and pain. All wounds are assessed and, if necessary, treated with antiseptic wound spray daily.

The experiments will be performed by experienced animal technicians and researchers. This will speed up the progress of the experiment and therefore reduce animal suffering and fear (fast induction of anesthesia, fast surgery, and maximum results with minimal animal handling).

Fetus

All sedation that is administered to the ewe is able to cross the placental barrier. Therefore, the fetus is also sedated during surgery. Upon closure of the uterus, a bolus of antibiotics is administered into the amniotic cavity in order to prevent *in utero* infection.

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.

For this project repetition of previously performed experiments is necessary for the following reasons: Previous studies of our group indicated that cell-based therapy may be a promising candidate to treat injury in the preterm brain. In the proposed experiments we will study the pathophysiology of this injury in further detail by adding new techniques (e.g. splenectomy) which have not been performed before. Furthermore we will test different cell-based therapies which have more potent anti-inflammatory and regenerative properties in vitro than the stem cells previously tested.

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

No

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

The sheep are housed in a confined space with limited room for movement in order to prevent fetal loss due to injury to the externalized fetal leads and catheters, which are connected to monitoring equipment and infusion pumps. However, the sheep will be housed near other sheep in olfactory, visual and auditory distance. This practice has been done successfully and has been evaluated for maternal stress hormones which appear to be low.

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.

Sheep will be operated under full-anaesthesia. Post-operatively they will receive analgesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

1. The ewe can experience post-operative wound infection
2. After surgery the sheep are placed in confined solitary housing
3. The sheep can go into preterm labor

Explain why these effects may emerge.

Although the sheep are operated on aseptically and have a permanent wound on the abdominal wall through which catheters and leads are exteriorized the chance for post-operative infection is small (personal experience). However, the sheep defecate in their own pen which always poses a risk for infection.

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

1. Sheep receive prophylactic antibiotics which are continued post-operatively for 5 days and longer if necessary. Moreover, the wounds are inspected and treated daily with chlorotetraspray. Moreover, the pen is cleaned daily.
2. Although the sheep are placed in solitary confined housing they are within auditory, visual and olfactory distance of other sheep.
3. Preterm labor cannot be prevented but is (based on experience) a very rare event. Moreover, preterm labor is a humane endpoint.

The fetus displays an acute physiological reaction illustrative of discomfort during and after asphyxia. However, due to a continuous "dormant" status of the fetal brain during gestation, the fetus is not aware of discomfort and will not experience it as such (1).

Opioids will affect receptors that are activated by different stimuli such as pain. In the disease situation of hypoxia-ischemia an abrupt shortage of oxygen and blood supply occurs. This occurs in a very immature fetus which has not yet developed the neuronal links of responding to such a shortage of blood and oxygen which is shown by the responses of the cardiovascular system. The neuronal system lacks the perception and response mechanisms due to immaturity.

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.

Humane endpoints for ewes:

1. Untreatable pain:
 - o Assessment of pain:
 - Lack of appetite
 - Grinding of teeth
 - Reluctance to stand/ excessive time lying down
 - Lethargy/depression: an unresponsive sheep with hung head and dull eyes can indicate pain, illness or discomfort.

The sheep receive post-operative pain medication. If a sheep does not respond to the maximum amount of pain medication within 24 hours, we consider the pain to be untreatable and define this as a human end-point.

2. Infection: The animals will be monitored via analyses of blood (pH, PaO₂, PaCO₂, base excess, lactate, glucose, Hb, Ht, HCO₃⁻, O₂ saturation) and vital parameters (temperature, ECG, blood pressure). However, instant analysis of blood for cellular components is not possible. Therefore, we need to rely on clinical parameters described below:
 - o Local (site of surgical wound): redness, pain, and swelling with or without pus that cannot be treated with local antiseptics or antibiotics are considered a human endpoint.
 - o Systemic: Elevation of the body-temperature, elevation of the heart-rate, lethargy, excessive time lying down.
3. Intra-uterine fetal death: Fetal death can be determined by evaluation of the fetal ECG, blood-pressure, and blood gas analysis
4. Pending labor: A sheep showing behaviour of pending labor will be taken out of the experiment
5. Abdominal hernia: Abdominal hernia will be assessed by palpation of the abdominal wound. When an abdominal hernia is determined, the sheep will be euthanized.

Humane endpoints for fetus:

Persistent bradycardia of less than 30 beats/min and a lactic acidosis with a pH<6.8 over a period of 6h not responding to fluid treatment

Indicate the likely incidence.

Based on previous experiments we have determined the incidence of reaching a human endpoint at 20%, which is mostly determined by *in utero* fetal death.

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').

Ewe: Severe

The ewe will undergo abdominal surgery with permanent exteriorization of cables and leads while being housed solitary in a confined space.

Lamb: Severe

The fetus will undergo chronic instrumentation and induction of hypoxia-ischemia but will not constantly receive **sedation and analgesia**.

The fetus displays an acute physiological reaction illustrative of discomfort during and after asphyxia.

However, due to a continuous "dormant" status of the fetal brain during gestation, the fetus is not aware of discomfort and will not experience it as such (1). However, we still consider this as a serious discomfort since it is acute abrupt and results in changes of brain activity, heart rate, and blood pressure, which are associated discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The fetus will be euthanized at the end of the experiment since examination of organ tissues (especially the brain) is crucial to determine the effects of our treatment(s).

The ewe will be euthanized since the discomfort during the experiment is severe, making re-use not possible. Moreover, undoing the effects of chronic instrumentation will cause an additional increase in discomfort.

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

Maastricht University

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015225

Bijlagen

2

Datum 24-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002015225. 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. 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

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

- Universiteit Maastricht

Plaats:

Maastricht

Datum:

21 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Maastricht University

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015225

Bijlagen

2

Datum 24-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 augustus 2015

Vervaldatum: 23 september 2015

Factuurnummer: 201570225

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002015225	€ 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.

DEC-advies projectvoorstel 2015-005

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-005
2. Titel van het project: *Therapeutic interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress.*
3. Titel van de NTS: *Therapeutische maatregelen om de uitkomst van premature kinderen te verbeteren.*
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC-UM
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED] of secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 10-07-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 17-07-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 22-07-2015 tot 12-08-2015
 - Van 12-08-2015 tot 14-08-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
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 dd. 22-07-2015/14-08-2015/17-08-2015

Strekking van de vragen:

Proposal:

1. 3.4.2. Waarom wordt het Texelse schapenras, bekend staand als ongemakkelijk lammerend, gekozen? De keuze van een gemakkelijk lammerend schapenras zou als verfijning ten aanzien van ongerief kunnen worden beschouwd. De DEC-UM wenst een motivatie waarom voor dit ras gekozen is.
2. 3.4.2. Is het valide om aan te nemen dat het deelonderzoek betreffende stamcellen translationeel relevant is gezien de mogelijkheid tot het ontwikkelen van maligniteit van deze stamcellen?
3. Ter verduidelijking van de grootte van het probleem, prevalentie en incidentie weergeven? Hoeveel van de 13500 preterm births hebben er last van?
4. 3.4.3: Hierin staat veel herhaling. De DEC-UM verzoekt u hier met name de samenhang tussen de verschillende doelen te onderbouwen.
5. De DEC vindt de onderbouwing voor de aantallen en de groepen onduidelijk en onvoldoende. U verwijst naar Sachs, we vernemen graag wat de kritische uitleesparameters zijn. Het gebruik van schapen met meer dan één foetus komt niet tot uiting in de totale aantallen.
6. Bij punt **aim 3b** staat een typo. A milestone - a miletstone. Gaarne corrigeren.

Appendix 1:

1. In het projectvoorstel wordt gemeld dat “But due to the risk of short- and long-term side effects, including impairment of neurological development, the routine use of glucocorticoids has been drastically reduced in BPD therapy in the last years”, terwijl in bijlage 1 wordt gesteld dat “Moreover, maternal intramuscular dexamethasone administration mimics the clinical standard nowadays”. In hoeverre lijkt dit een discrepantie?
2. U geeft aan dat “2 days before preterm delivery, the ewes will be given an intramuscular injection of dexamethasone, which enhances fetal lung maturation and allows the fetus to be ventilated postnatally”. Vergroot deze toediening van dexamethason de kans op een abortus bij het schaap en in hoeverre is deze toediening van invloed op de immuunrespons ten aanzien van de Ureaplasma parvum-infectie?
3. Hoe wordt in de nutritionele ondersteuning van het premature lam voorzien met name ook ten aanzien van het risico op hypoglycemie?
4. Met behulp van echografie zou toch inzicht moeten kunnen worden verkregen in kennelijke één- of meerlingdracht?

5. K: is de classificatie voor het ongerief van het lam correct (non-recovery in plaats van anderszins) daar het lam wel bij bewustzijn is tot aan de euthanasie? De DEC-UM verzoekt aan te geven of de lammeren onder anesthesie of sedatie zijn? Wanneer de lammeren onder sedatie zijn lijkt de term non-recovery niet op zijn plaats.
6. De DEC verzoekt replacement punten te noemen die wel ter zake doen.
7. H: Gaarne uitleggen welke methode van anesthesie u toepast, u hebt geen toelichting gegeven.
8. De oaien krijgen post operatieve antibiotica. Het is niet helder op welke procedure deze behandeling volgt. Na de intra-uterine injectie? Wanneer worden de oaien precies gedood?
9. De omschrijving van “adverse effects” ontbreekt voor het lam.

Appendix 2:

1. De lammeren zullen van 5 tot 10 dagen worden geventileerd. Wat bepaalt de uiteindelijke duur van ventilatie? Het beperken van deze periode zal het risico op mogelijke complicaties, met daaruit volgend mogelijk ongerief en uitval verminderen.

Appendix 3:

1. Er wordt gesteld dat: “We cannot do biochemical analysis of ovine blood, White blood cell count is not reliable due to post-operative elevation”. Dit lijkt een valide uitspraak voor een ziekenhuislaboratorium, maar een veterinaire laboratorium zou er geen moeite mee moeten hebben. Er lijkt weinig grond niet ook de dieren te monitoren middels bloedonderzoek. Dit lijkt ook voor glucose erg belangrijk om het overlevingspercentage van de lammeren op niveau te houden.
2. De doelen omschreven hebben allen betrekking op het brein van het lam. Er wordt in de omschrijving van de procedures ook ondernomen om gastro-intestinale absorptie en motiliteit te kunnen bestuderen.
Het extra uitvoeren van extra implantatie en handelingen verhoogd de kans op ongerief en uitval. De DEC-UM wenst een aanvullende onderbouwing.
3. Refinement. Moet uit deze omschrijving geconcludeerd worden dat de ooi altijd in de aanwezigheid van een andere ooi zal zijn? De DEC-UM gaat er vanuit dat de oaien met meerdere dieren gehuisvest worden (met meerdere dieren in één ruimte).
4. Refinement. Is de cortisol waarde alléén een voldoende argument voor de stelling dat de schapen geen stress hebben? De DEC-UM is van mening dat dit wel degelijk een significante aantasting van het welzijn is.
5. Wat is bekend over het ongerief voor de foetus gedurende het globale hypoxie-ischemisch insult?
Kunt u aangeven waar u op baseert dat zij geen ongerief ervaren? Zou ongerief kunnen worden gereduceerd door toediening van opiaten voorafgaand aan het hypoxie-ischemisch insult?
6. **Appendix 2 en 3.**
Sectie L: De onderbouwing voor het doden van de dieren ontbreekt. De DEC-UM wenst een onderbouwing.

NTS:

De DEC-UM heeft een vraag gesteld over de non recovery bij appendix 1. Graag de appendix en de NTS in overeenstemming brengen.

- Datum antwoord dd. 12-08-2015

- Strekking van het (de) antwoord(en) **Deze hebben de vragen van de DEC niet geheel verhelderd.**
- De antwoorden hebben geleid tot **gedeeltelijke** aanpassing van de aanvraag.

Dd. 14-08-2015 heeft de DEC-UM nog gevraagd om een aantal tekstuele aanpassingen.

Dd. 17-08-2015 heeft de DEC-UM de volgende vragen nog gesteld:

- In de experimenten met de prematuren worden de lammeren tot geboorte gebracht na 132 dagen zwangerschap. Op deze leeftijd wordt anesthesie wenselijk/noodzakelijk geacht. Bij aim 3 worden andere experimenten, in de uterus, uitgevoerd. Het argument dat de lammeren in deze experimenten geen pijn lijden is dat zij nog geen volledig ontwikkeld neurale systeem hebben (appendix 3 vraag 5). In de appendix 3 staat niet vermeld in welke periode van de dracht het hypoxie-ischemie insult wordt veroorzaakt. Wel wordt de 147 dagen drachtperiode benoemd als argument voor de keuze voor de diersoort. Kunt U aangeven op welke dag van de dracht het insult precies wordt gegeven?
- In antwoord op vraag 9 geeft U aan dat "Pain will be prevented by continuous sedation and analgesia". Dient aangenomen te worden dat ook hier anesthesie wordt bedoeld in plaats van sedatie (ook bij de beantwoording van vraag 5 lijkt anesthesie welhaast gelijk te worden gesteld aan sedatie als anesthesie = sedatie + analgesie)?

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) Geen advies elders gevraagd.

- 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): **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren: **JA**

4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering **NVT**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en): **JA**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. **Het belang van de doelstelling wordt door de DEC-UM erkend, te weten: De effectiviteit van therapeutische maatregelen om de uitkomst van premature kinderen te verbeteren.**
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project: **Naar de overtuiging van de DEC-UM beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen 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 10g, 13, 13c3 van dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **JA**

x Huisvesting en verzorging

x Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)

x Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

x Dodingsmethode (13.c.3)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd: **JA**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**.

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. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.
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 geen sprake van belangwekkende milieueffecten
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd

D. Ethische afweging

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren (niet), de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt (niet) gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project (geen) voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

Ethische afweging DEC-UM:

Het project "*Therapeutic interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress*", wordt door de DEC-UM beoordeeld als een relevante, nieuwe aanpak in de optimalisatie van de behandeling van vroeggeboren kinderen. Dit onderzoek heeft zowel een wetenschappelijk als maatschappelijk belang. Resultaten kunnen te zijner tijd ten goede komen aan vroeggeborenen en hun familie. De gekozen strategie en de concrete doelstellingen lijken passend en haalbaar en kunnen op dit moment niet zonder dierproeven worden behaald. Het project behelst het gebruik van schapen - ooiën en lammeren - die maximaal matig ongerief zullen ondervinden en die veelal in het kader van de proef worden gedood. Bij de voorgestelde dierproeven en de verzorging, behandeling en huisvesting van de proefdieren wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. De betrokken onderzoekers zijn zeer ervaren en goed op de hoogte van de wetenschappelijke ontwikkelingen in het veld. Men bouwt voort op onderzoek dat al eerder is beoordeeld. Er is geen sprake van duplicatie.

Conclusie: De DEC-UM acht enerzijds het project "*Therapeutic interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress*" van substantieel belang. Anderzijds onderschrijft zij de intrinsieke waarde van het dier. Gezien het belang en de kwaliteit van het voorgestelde project acht de DEC-UM het gebruik van dieren hier 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.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-UM tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar is.

Aan: Centrale Commissie Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

<i>Ons kenmerk</i>	<i>Doorkiesnummer</i>	<i>Maastricht</i>
██████████ 124-15	0 ██████████	14-09-2015

Betreft: reactie op uw mail dd. 11-09-2015 betreffende aanvraagnummer
 AVD107002015225, ons kenmerk: 2015-005.

DEC-UM
 Voorzitter DEC-UM
 ██████████
 p/a secretariaat DEC-UM

Geachte mevrouw ██████████

Secretariaat DEC-UM

██████████

In antwoord op Uw vragen het volgende:

Bezoekadres

Uw vraag 1: In het advies geeft de DEC aan, bij punt 5, dat er sprake is van bijzonderheden op enkele gebieden in de aanvraag. Zou u meer uitgebreid willen uitleggen wat de bijzonderheden zijn, en hoe de DEC tot zijn oordeel is gekomen dat deze bijzonderheden voldoende gemotiveerd zijn?

██████████
 ██████████ Maastricht

Postadres

Postbus 616
 6200 MD Maastricht

Antwoord DEC-UM: Het betreft de volgende bijzonderheden 1) Huisvesting en verzorging met als locatie: instelling vergunninghouder (10.g), 2) Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13) en 3) Dodingsmethode (13.c.3). Daar de aanvraag betrekking heeft op een kudde dier als het schaap heeft de DEC-UM zich ervan vergewist dat alhoewel de oaien individueel worden gehuisvest binnen de UM zij contact kunnen hebben met andere oaien middels reuk, gehoor en visuele waarneming. Ten aanzien van de verdoving/pijnbestrijding/dodingsmethode hebben wij ook nadere aanvulling gevraagd. Er blijkt te gelden dat de oaien worden geanaestheiseerd juist voorafgaand aan de *sectio caesarea* (induction of anesthesia through thiopental i.v., continuation with isoflurane 1-2% and remifentanyl i.v. as well as local analgesia of surgical wounds with lidocaine). Tevens geldt voor de lammeren *in utero* sedatie via anesthesie van de ooi, terwijl *ex utero* experimenten worden uitgevoerd middels ketamine and midazolam i.v. Zowel oaien als lammeren worden geëuthanaseerd middels een overdosis thiopental i.v. te weten onder anesthesie aan het einde van een *sectio caesarea* respectievelijk tijdens sedatie (bijlagen 1 en 2) of *in utero* (bijlage 3). De dieren uit de experimenten, beschreven in bijlage 3, worden niet geëuthanaseerd onder algehele anesthesie, maar zullen wel sedatie ontvangen voordat euthanasie zal plaatsvinden.

Uw vraag 2: Bovenop geeft de DEC aan dat het ongerief realistisch ingeschat en geclassificeerd is, maar in de aanvraag, in bijlage dierproef 2 staat het ongerief niet vermeld. Weet de DEC wat het ongerief van de dieren in dierproef 2 is?

Antwoord DEC-UM: Voor de dierproeven 1 en 2 binnen de projectaanvraag geldt dat “during the mechanical ventilation, the lambs are continuously sedated and will not regain full conscience. At the end of the experiment they will be euthanized while sedated. (Therefore, the classification of the experiment is considered to be non-recovery.)
Abusievelijk is dit niet vermeld in bijlage 2, maar daar geldt hetzelfde als vermeld onderaan bijlage 1.

Hopenlijk zijn Uw vragen hiermee naar wens beantwoord.



Voorzitter DEC-UM

i.o



Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 21 oktober 2015 14:38
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: RE: verzoek tot aanpassing NTS bij aanvraag AVD107002015225
Bijlagen: DEC-UM 2015-005_Niet technische samenvatting_V4.0_after approval.docx

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Dear [REDACTED]

Please find the revised summary in the enclosure.

Best regards

[REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 [REDACTED]
 Maastricht University Medical Center

From: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]
 Sent: Monday, October 19, 2015 9:33 AM
 To: [REDACTED]
 Cc: [REDACTED]
 Subject: verzoek tot aanpassing NTS bij aanvraag AVD107002015225

Geachte [REDACTED],

Op 21 augustus 2015 hebben we uw aanvraag met titel "Therapeutic interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress" en aanvraagnummer AVD107002015225 ontvangen.

De CCD heeft uw aanvraag beoordeeld, en besloten deze gedeeltelijk goed te keuren (alleen voor de dierproeven 1 en 2). Daarom hebben wij een herziene versie van de Niet Technische Samenvatting van u nodig, waarin u alleen het vergunde gedeelte van uw project beschrijft.

De commissie is van mening dat dit project bestaat eigenlijk uit twee aparte projecten: project 1) de dierproeven 1 en 2, en project 2) de dierproef 3. De enige samenhang bestaat uit het feit dat alle dierproeven gericht zijn op onderzoek naar efficiënte therapieën bij pre-term geboorte.

De eerste twee dierproeven 'Intra-uterine inflammation' en 'Ventilation-induced lung injury' vormen een toetsbare eenheid aangezien zowel de experimentele opzet, als de onderzoeksvraag en doelstelling vergelijkbaar zijn. Beide dierproeven maken gebruik van hetzelfde infectiemiddel, zijn gefocust op longontwikkeling. Bovendien wordt dezelfde onderzoeksprocedure gebuikt in beide dierproeven.

De derde dierproef 'Global hypoxia-ischemia' heeft een andere experimenteel opzet, bevat onderzoek naar problemen in het brein, milt en andere organen. Bovendien, dierproef 3 dient zelf 5 doelstellingen. Tot slot, de dieren in de derde dierproef zullen ernstig ongerief ondergaan waardoor een beoordeling achteraf vereist zijn. Voor dierproef 3 zou een aparte aanvraag moeten worden ingediend.

Zodra wij de nieuwe versie van de NTS hebben ontvangen sturen wij de beschikking en vergunning aan u toe. Tot die tijd kunt u niet met uw project "Therapeutic interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress" beginnen.

We hopen snel van u dit document te ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Uitvoeringsexpert

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: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl<<mailto:info@zbo-ccd.nl>>. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Maastricht University

Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD107002015225

22 OKT. 2015

Datum
Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 21 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Therapeutische interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress" met aanvraagnummer AVD107002015225. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft een aangepaste versie van de Niet-technische samenvatting naar de CCD gestuurd.

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. U kunt met uw project "Therapeutische interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress" starten, met de dierproeven opgenomen in de vergunning. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2015 tot en met 30 november 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van de vergunning voor maximaal 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 21 augustus 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 15 september 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De vragen hadden betrekking op de bijzonderheden in de aanvraag en op het ongerief van de dieren te gebruiken in dierproef 2.

Wij kunnen ons niet geheel vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. De CCD is van mening dat dit project bestaat

eigenlijk uit twee aparte projecten: project 1) de dierproeven 1 en 2, en project 2) de dierproef 3. De enige samenhang bestaat uit het feit dat alle dierproeven gericht zijn op onderzoek naar efficiënte therapieën bij pre-term geboorte.

De eerste twee dierproeven 'Intra-uterine inflammation' en 'Ventilation-induced lung injury' vormen een toetsbare eenheid aangezien zowel de experimentele opzet, als de onderzoeksvraag en doelstelling vergelijkbaar zijn. Beide dierproeven maken gebruik van hetzelfde infectiemiddel, zijn gefocust op longontwikkeling. Bovendien wordt dezelfde onderzoeksprocedure gebruikt in beide dierproeven.

De derde dierproef 'Global hypoxia-ischemia' heeft een andere experimenteel opzet, bevat onderzoek naar problemen in het brein, milt en andere organen. Bovendien, dierproef 3 dient zelf 5 doelstellingen. 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 zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op


<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

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: Maastricht University
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 december 2015 tot en met 30 november 2020, voor het project "Therapeutische interventions to improve neonatal outcomes in the course of perinatal stress" met aanvraagnummer AVD107002015225, gedeeltelijk volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies omdat de CCD van mening is dat dit project bestaat eigenlijk uit twee aparte projecten: project 1) de dierproeven 1 en 2, en project 2) de dierproef 3. De enige samenhang bestaat uit het feit dat alle dierproeven gericht zijn op onderzoek naar efficiënte therapieën bij pre-term geboorte.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 augustus 2015 en aangepast op 21 oktober 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 augustus 2015, ontvangen op 21 augustus 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Intra-uterine inflammation	Schapen (<i>Ovis aries</i>) / volwassenen en foetale schapen	96	Matig / moderate	
Ventilation-induced lung injury	Schapen (<i>Ovis aries</i>) / volwassenen en foetale	96	Terminal / non-recovery	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk 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 W16-01									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015227								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Mail aanvullende informatie 6-10-2015				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	
10	Mail beschikking 14-10-2015				x		x		

27 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 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? <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 10300 <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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	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									
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. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td>Geert Grooteplein-Noord 9</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9102</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6525EZ Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein-Noord 9	Postbus	9102	Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
Straat en huisnummer	Geert Grooteplein-Noord 9																
Postbus	9102																
Postcode en plaats	6525EZ Nijmegen																
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 20%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Onderzoeker in opleiding</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	Onderzoeker in opleiding		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker in opleiding																
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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 80%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="width: 20%;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>PHD student</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	PHD student		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PHD student																
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 [redacted] Dhr. Mw.
- Functie Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling [redacted]
- Telefoonnummer [redacted]
- E-mailadres [redacted]
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 25 . 09 . 2015
- Einddatum 25 . 09 . 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([redacted])
- E-mailadres [redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 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, factuurinformatie

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED] Instantie voor dierenwelzijn

Plaats [REDACTED] Nijmegen

Datum [REDACTED] 25 - 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).
- 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. | Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes |

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.
-

The annual average proportion of the US population with a musculoskeletal condition has increased from 28 percent to more than 33 percent of the population between 1996 to 1998 and 2009 to 2011 (U.S. Department of Health and Human Services, 1996-2011). Impaired bone regeneration is one of these musculoskeletal conditions. Bone possesses the intrinsic capacity for regeneration as part of the repair process in response to injury (Bates and Ramachandran, 2007; Einhorn, 1998). Bone is regenerated with its pre-existing properties largely restored, and with the newly formed bone being eventually indistinguishable from the adjacent uninjured bone (Einhorn, 1998). However, there are cases of fracture healing in which bone regeneration is impaired, such as delayed union or non-union. Additionally, there are conditions in which bone regeneration is required in large quantity, beyond the normal potential for self-healing, such as for skeletal reconstruction of large bone defects created by trauma, infection, tumor resection and skeletal abnormalities, or cases in which the regenerative process is compromised (Dimitriou et al., 2011), including osteoporosis and diabetes mellitus. In these cases, the bone defects have to be reconstructed surgically by use of bone grafting materials. Bone is the second most commonly implanted material in the human body, after blood transfusion (Marino and Ziran, 2010). The need for bone grafting procedures is increasing worldwide. The number of bone grafting procedures ranges from 0.5 million in the US to 2.2 million worldwide annually (Calori et al., 2011). This is amongst other causes due to systemic diseases that affect the bone regenerative capacity of the body in a negative way, predominantly being osteoporosis and diabetes mellitus. Various medical practitioners, for example in trauma surgery, plastic and reconstructive surgery, orthopedics and dentistry face the complexity of reconstructing bone defects every day.

Different bone regenerative treatments are currently clinically applied. Autografting, in which autologous bone is used to regenerate bone defects, is the mostly used and most well known procedure for bone regenerative treatment worldwide. The major disadvantage of autografting is the need for an additional surgical procedure and site to harvest donor bone. This autologous donor bone is commonly harvested from the crista iliaca, which is easily accessible and contains a relatively large amount of corticocancellous bone (Giannoudis et al., 2005). The harvest of autologous donor bone from the crista iliaca is associated with risk of gait disturbances, deviation in form, meralgia paresthetica (neuropraxia N. cutaneus femoralis lateralis), or herniation of intestines. An alternative treatment modality is the use of allograft bone, in which processed cadaver bone is transplanted into the patient. However, bone allograft is not always accepted as a substitute for several reasons, including (i) undesired graft-versus-host reactions, (ii) graft necrosis, (iii) delayed incorporation, and (iv) relatively high costs (Giannoudis et al., 2005). Finally, similar to autologous bone grafts, allografts suffer from limited availability (Banwart et al., 1995).

In view of the drawbacks of autologous and allogeneous bone grafts, synthetic bone graft materials have become heavily explored as alternatives. As synthetic graft materials are off-the-shelf available, a second surgical procedure to harvest autologous bone is not necessary and no donor site complications can occur. A variety of synthetic graft materials have been evaluated as scaffolds in bone repair, including the calcium phosphate (CaP) based bioactive ceramic hydroxyapatite (HA), beta-tricalcium phosphate (β -TCP), and biphasic calcium phosphate (BCP), bone cements, bioactive glasses, and biodegradable synthetic polymers (Gu et al., 2013). Among the synthetic graft materials, CaP-based bone substitute materials have been mostly explored. The main advantage of these materials is the excellent biocompatibility due to their chemical similarity to the natural mineral of bone tissue (Ruhé et al., 2006; Habraken et al., 2006). Their favorable biological performance is characterized by bioactivity (i.e. the capacity to directly bond to bone) and osteoconductive properties (i.e. to guide bone growth over their surface).

A major drawback of CaP-based bone substitute materials, however, is the generally poor degradation. Ideally, the degradation is balanced with new bone formation to warrant stability and mechanical strength during the regenerative phase. CaP-based bone substitute materials can be degraded by two parallel pathways: active resorption in a cell-mediated process, and passive resorption in an acellular process dependent on the chemical solubility of the material. Absence of adequate porosity of the material delays degradation and impedes cell ingrowth (Gauthier et al., 1998). Several approaches have been explored to introduce porosity and therefore improve degradability (Barralet et al., 2002; Habraken et al., 2008; Lopez-Heredia et al., 2012). This can be achieved by the addition of other materials that have a faster degradation rate than the cement (i.e. CaP cement (CPC)). When these materials degrade, a porous structure remains, allowing fluid flow throughout the cement and therefore improving degradation. These materials can be added in form of fast-degrading microparticles, e.g. made of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), that dissolve after cement setting (Ruhé et al., 2005; Habraken et al., 2008; Qi et al., 2008; Félix Lanao et al., 2011).

For clinical purposes, it is important that degradation can be controlled, predicted and monitored, and hence new bone formation can be regulated in healthy and compromised conditions (e.g. osteoporosis and diabetes mellitus (DM)). Particularly in elderly patients that already suffer from decreased regenerative capacity, additional compromised conditions that interfere with osteoblastic bone formation and/or osteoclastic bone resorption are likely to affect the biological performance of bone grafts. Osteoporosis and DM interfere drastically with bone regeneration, affecting general wound healing processes and the balanced bone homeostasis (Fuegl et al., 2011).

Osteoporosis: osteoporosis is the most common bone disease in the US. The prevalence is expected to intensify, as the population ages (Pei et al., 2015). Osteoporotic patients present an imbalance in the level of bone formation and resorption during bone remodeling, resulting in a reduced bone mineral density causing lower bone mass and deterioration of bone tissue micro-architectures (Fini et al., 2004). Therefore, bone healing around dental and orthopedic implants placed in osteoporotic patients is negatively influenced and more prone to implant failure (Alghamdi et al., 2014).

Diabetes mellitus: DM affects inflammatory processes that precede and are part of wound healing. Many studies performed in animal models, and in rat models in particular, suggest that insulin deficiency can result in decreased bone integrity. For instance, measurements of bone strength in DM models have revealed that DM and insulin deficiency can have a negative impact on bone strength and bone composition. In a long-term DM model, Einhorn et al. (1988) showed that diabetic bones display specific defects of bone mineralization, including decreased hydroxyapatite crystal perfection, decreased calcium-to-phosphate composition of the ash, and decreased ash content in certain bones such as the tibial metaphysis.

Osteoporotic and diabetic patients undergoing medicinal therapy may present a complex bone healing process, not necessarily positive or similar to the healthy condition (Iizuka et al., 2008; Hou et al., 2011). During fracture healing, the use of bisphosphonates (i.e. the most common anti-osteoporotic drug) or insulin (i.e. the general treatment modality for diabetic patients) is controversial because of the conflicting action of these medications on osteoclastic activity (Thomas et al., 1998; Schindeler et al., 2008). Osteoclasts are important for remodeling the callus into cortical bone (Einhorn et al., 1998) but insulin/bisphosphonate inhibits osteoclast-mediated bone resorption in order to prevent bone loss and improve bone strength (Thomas et al., 1998; Murakami et al., 1995).

For these reasons, it is necessary to address:

- The biological performance of CaP-based bone substitute materials (i.e. the degradation rate of these materials and replacement by new bone) under different health conditions;
- The specific mechanisms of bone response to the administered medication for DM and osteoporosis.

References

-U.S. Department of Health and Human Services, The Burden of Musculoskeletal Conditions in the United States, 1996-2011

- Bates P, Ramachandran M. *Basic Orthopaedic Sciences*. 2007:123-134
- Einhorn TA. *Clin Orthop Relat Res*. 1998, 355(Suppl):S7-21
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. *BMC Medicine*. 2011 9:66
- Marino JT, Ziran BH. *Orthop Clin North Am*. 2010 Jan;41(1):15-26
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamont C. *Injury, Int. J. Care Injured* 42 (2011) S56–S63
- Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36S, S20—S27
- Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1995 May 1;20(9):1055-60
- Gu Y, Huang W, Rahaman MN, Day ED. *Acta Materialia* 9 (2013) 9126-9136
- Ruhé PQ, Hedberg-Dirk EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA, Mikos AG. *Tissue Eng*. 2006 Apr;12(4):789-800
- Habraken WJ, Wolke JG, Mikos AG, Jansen JA. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2006;17(9):1057-74
- Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, Pilet P, Daculsi G. *Biomaterials* 19 (1998) 133-139
- Barralet JE, Grover L, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR. *Biomaterials* 2002;23(15):3063-72
- Habraken WJ, Zhang Z, Wolke JC, Grijpma DW, Mikos AG, Feijen J, Jansen JA. *Biomaterials* 29 (2008) 2464-2476
- Lopez-Heredia MA, Sariibrahimoglu K, Yang W, Bohner M, Yamashita D, Kunstar A, van Apeldoorn AA, Bronkhorst EM, Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Itatani K, Yang F, Salmon P, Wolke JG, Jansen JA. *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 404-414
- Ruhé PQ, Hedberg EL, Padron NT, Spauwen PH, Jansen JA. *Inc. J Biomed Mater Res* 74A: 533–544, 2005
- Habraken WJ, de Jonge LT, Wolke JG, Yubao L, Mikos AG, Jansen JA. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2008
- Qi X, Ye J, Wang Y. *Acta Biomaterialia* 4 (2008) 1837-1845
- Félix Lanao RP, Leeuwenburgh SC, Wolke JG, Jansen JA. *Acta Biomaterialia* 7 (2011) 3459-3468
- Fuegl A, Tangl S, Keibl C, Watzek G, Redl H, Gruber R. *Clin Oral Implants Res*. 2011 May;22(5):524-9
- Pei M, Li J, McConda DB, Wen S, Clovis NB, Danley SS. *Bone* 78 (2015) 1-10.
- Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, Borsari V, Giardino R, Nicolini A, Carpi A. *Biomed Pharmacother*. 2004 Nov;58(9):487-93
- Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. *Tissue engineering: Part C Volume 20, Number 6, 2014*.
- Einhorn TA, Boskey AL, Gundberg CM, Vigorita VJ, Devlin VJ, Beyer MM. *J Orthop Res*. 1988;6(3):317-23
- Iizuka T, Matsukawa M. *Climacteric*. 2008 Aug;11(4):287-95

-Hou CJ, Liu JL, Li X, Bi LJ. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2012 Mar;41(3):400-7

-Thomas DM, Udagawa N, Hards DK, Quinn JM, Moseley JM, Findlay DM, Best JD. *Bone.* 1998 Sep;23(3):181-6

-Schindeler A, Ramachandran M, Godfrey C, Morse A, McDonald M, Mikulec K, Little DG. *J Orthop Res.* 2008 Jan;26(1):65-74.

-Murakami H, Takahashi N, Sasaki T, Udagawa N, Tanaka S, Nakamura I, Zhang D, Barbier A, Suda T. *Bone.* 1995 Aug;17(2):137-44.

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 aim of this project is to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions). The aim of this project is achievable because of the knowledge of bone regenerative treatments and ceramics that is internationally gained in the past decades, on which this project is founded. An improvement in terms of biological performance of CaP-based bone substitute materials as we know them today is expected because of the ability to combine CaP-based bone substitute materials with fast-degrading materials that induce porosity (porogens) and therefore improve the degradation rate and the ability to combine CaP-based bone substitute materials with bone stimulating agents to improve the formation of new bone. Furthermore, achievement of this aim is supported by the fact that the CaP-based bone substitute materials that will be implanted *in vivo* were living up to the standards (i.e. ability to set, cohesive and easy to use) during *in vitro* testing before being implanted *in vivo* and that *in vivo* procedures (i.e. surgery) and histological analysis will be performed by researchers that have the available expertise.

3.3 Relevance

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

Research is necessary to develop treatment modalities that enable optimized degradation properties and accelerated degradation of synthetic CaP-based bone substitute materials to allow new bone formation. From a material perspective, these modalities have been explored by combining synthetic CaP-based matrices (e.g. CaP cement (CPC)) with fast-degrading materials as porogens (i.e. polymers, bioinorganics, other CaP-based

materials) and by combining synthetic CaP-based matrices with bone stimulating agents (e.g. bioinorganics). Pre-clinical studies provide further insight in the biological performance of these CaP-based bone substitute materials in an *in vivo* environment.

It is scientifically, as well as socially relevant to investigate the difference in biological performance of bone substitute materials in healthy and compromised conditions (i.e. conditions compromising bone regeneration – osteoporosis and diabetes mellitus) because these compromised conditions are likely to affect the biological performance of bone grafts, because of their interference with osteoblastic bone formation and/or osteoclastic bone resorption.

From a social perspective, once a reliable, controlled and compliant medical device for bone regeneration purposes can be made clinically available for healthy patients with bone defects as well as for patients with a compromised medical condition linked to impaired bone healing – such as the above mentioned patients with osteoporosis and diabetes – with bone defects, an increasing number of patients with dental, maxillofacial, orthopedic and spinal bone defects can benefit from this.

3.4 Research Strategy

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

The project is designed in such a way that the biological performance of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials can be evaluated on:

1. Efficacy in terms of biocompatibility of the developed CaP-based bone substitute material.
2. Efficacy in terms of controlled degradability of the developed CaP-based bone substitute material / new bone formation at the implant site in:
 - Healthy conditions
 - Compromised health conditions that will be treated (osteoporosis and diabetes mellitus)
3. Efficacy in terms of enhanced bone formation at the implant site by release of drugs (e.g. antibiotics) or substances that improve bone formation (e.g. bioinorganics) from the CaP-based bone substitute material.

The developed CaP-based bone substitute materials will be screened for biocompatibility and biological performance in healthy conditions and in osteoporotic or diabetic conditions that will be treated with medication, because this disease would also be treated in human patients. After screening, the long-term biological performance of the materials and performance of the materials in an animal bone model comparable to the human bone model will be evaluated. Efficacy in terms of accelerated degradability and new bone formation at the implant site will be evaluated in comparison to a legally marketed bone substitute.

Furthermore, release of drugs (e.g. antibiotics) or substances (e.g. bioinorganics) from the CaP-based bone substitute materials will be investigated to improve the material in terms of decreasing the infection risk of the surgical site and enhancing new bone formation, both improving and accelerating the healing of the bone defect.

Evaluation on degradation of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials and new bone formation at the implant site will consist of descriptive histology, quantitative histomorphometry and evaluation of sequential fluorochrome labeling.

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.

All developed synthetic CaP-based bone substitute materials are tested *in vitro* on handling properties, (i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material) before they will be tested *in vivo*. In the *in vivo* studies, the biological performance of the CaP-based bone substitute materials will be evaluated using ectopic implantation of pre-set scaffolds and either orthotopic injection of CaP cements (CPCs) or orthotopic implantation of pre-set scaffolds in bone defect models. Efficacy of the developed synthetic CaP-based bone substitute materials will be proven by evaluation of the implanted materials in various animal models:

- Ectopic implantation of the materials in rats to evaluate biocompatibility and the ability of ectopic bone formation.
- Orthotopic implantation of the materials, creating bone defects in healthy rats, rabbits and goats (in this specific order on the timeline of this project), making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model. The defects will be filled with the developed synthetic bone substitute material.
 - In healthy rats and rabbits bone defects will be created in the femora (bilaterally).
 - In goats bone defects will be created in the femora and iliac crests (bilaterally) and by performing sinus floor elevation procedures (bilaterally). All defects (including the sinus floor) will be filled with the developed CaP-based bone substitute material.
- Orthotopic implantation of the materials, creating bone defects in health compromised animal models. Achieving compromised conditions by inducing osteoporosis or diabetes. Health compromised conditions will be conditions in which a systemic disease (e.g. osteoporosis or diabetes) is chemically or surgically induced. In case of an animal model with a systemic disease, this disease will be treated with the appropriate drugs as would be done in humans.

The basic outline of the different components of this project will be as follows:

The first step of the *in vivo* research strategy (after *in vitro* testing) is screening of the developed synthetic bone substitute materials for biocompatibility and biological performance in healthy rats. This will be done by subcutaneous implantation (ectopic) and implantation in both

femoral condyles (orthotopic). Rats are the 'lowest animal species' suitable for testing bone substitutes. Simultaneously, bone substitute materials will be tested orthotopically in rats with treated osteoporosis or diabetes to evaluate their performance in terms of new bone formation in these conditions.

Appealing CaP-based bone substitute materials will then be tested in a rabbit femoral condyle model, allowing larger femoral condyle bone defects and long-term follow-up. This is necessary to evaluate the long-term performance of the implanted materials in a defect that is large enough to need a bone substitute material to heal and would not heal without a bone substitute material. The long-term follow-up time is based on the time point at which implantation time coincides with complete degradation of the material and new bone formation. In rabbits this is 26 weeks. Because of the difference in bone metabolic rate between smaller (rabbit) and larger animals, the rabbit animal model is the most suitable model for long-term follow up of the biological performance of bone substitute materials.

Making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model, goats are used to perform implantation of the most appealing CaP-based bone substitute materials orthotopically (i.e. femoral condyles, iliac crests and sinus floor elevation procedures). The goat is a suitable animal model for testing human implants and materials as they are considered to have a metabolic rate and bone-remodeling rate similar to that of humans (Anderson et al., 1999; Spaargaren, 1994). Bone healing capacity of goat bone is comparable with that of humans (Dai et al., 2005). The goat is also a suitable animal model because of the size and shape of the bones and similarity in loading properties. In rabbits this cannot be tested because of the differences in stance between the species (Pearce et al., 2007). The use of multiple implantation sites (i.e. different bones) will make it possible to compare the biological performance of the materials and bone response between implantation sites. The locations of the implants are chosen based on the similarity to the clinical situation in humans (i.e. sinus elevation procedures) and based on the easy accessibility of corticocancellous bone in these bones.

A component of this project is the focus on addition of drugs or substances to the CaP-based bone substitutes to further improve the materials in terms of diminishing the infection risk at the surgical site when released from the material and – as a result or as a direct effect – by accelerating degradation and concomitant new bone formation.

The developed synthetic bone substitute materials will be compared to a legally marketed bone substitute.

References

-Anderson ML, Dhert WJ, de Bruijn JD, Dalmeijer RA, Leenders H, van Blitterswijk CA, Verbout AJ. *Clin Orthop Relat Res.* 1999 Jul;(364):231-9

-Spaargaren DH. *Acta Biotheor.* 1994 Dec;42(4):263-9

-Dai KR, Xu XL, Tang TT, Zhu ZA, Yu CF, Lou JR, Zhang XL. *Calcif Tissue Int.* 2005 Jul;77(1):55-61

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

The main goal of this project is to develop a synthetic CaP-based bone substitute material for clinical use in bone regeneration treatments. This synthetic bone substitute material should obey to clinical requirements, such as being safe for the patient, improving bone formation and having excellent handling properties to fit the work of the surgeon. To reach the main goal of this project, different components should be considered and tested in animal experiments.

First of all, the biological performance of the developed synthetic bone substitute material will be evaluated in rats, the 'lowest animal species' possible for research in bone regeneration and highly suitable for rapid screening of the biological performance. Simultaneously, biological performance in healthy rats will be compared to biological performance in health compromised conditions. When in rats one of the evaluated materials does not live up to the expected biological performance, this material in its current form will not be tested further in animals until it is adjusted.

When the material is showing the desired biological performance (accelerated degradation and enhanced bone formation at the implant site), the material will be tested for its long-term performance in rabbits, in which follow-up time coincides with complete degradation of the material and concomitant new bone formation.

The use of rats, rabbits and goats in this specific order (on the timeline of this project), makes an increase in the size of the defects possible and is providing an increase in similarity to the human bone model. Because of the latter, implantation of the developed CaP-based bone substitute materials in goats will provide pre-clinical results in terms of biological performance of the material most comparable to the clinical situation (i.e. in human). The release of drugs or substances that improve bone formation by direct or indirect effects will improve the material even further.

Following the different steps of this project will lead to the aim of this project: to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions).

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	Bone substitutes in healthy rats
2	Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats
3	Bone substitutes in healthy rabbits
4	Bone substitutes in healthy goats



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Bone substitutes in healthy rats</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Bone substitutes in healthy rats
Serial number	Type of animal procedure					
1	Bone substitutes in healthy 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.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism, specifically a mammal. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies (containing mammals) are required to investigate biological performance. Bone substitute materials will be investigated using two research lines: an ectopic (i.e. subcutaneous) implantation line and an orthotopic (i.e. femora bilaterally) implantation line. For each developed material, both lines should be investigated. Both lines can be investigated at the same time in the same rat, diminishing the number of rats needed. Ectopic implantation of the materials in rats is necessary to evaluate biocompatibility and the ability of ectopic bone formation (osteinductivity; bone formation without presence of surrounding bone). Orthotopic implantation of the materials is necessary to evaluate the biological performance in a bone defect, comparable to a clinical situation in which the bone can respond to the bone substitute material. This experimental approach leads to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

The smaller the animal, the higher the metabolic rate. Therefore, the metabolic rate of the animal determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment. Shorter implantation periods (i.e.

faster data sampling) are required in rats because of the fast healing (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 2 and 6 weeks (Renno et al., 2013), which allows comparison of the biological performance of the material in an early phase and a late phase of material degradation and bone regeneration. It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. The implantation periods are suitable for rapid screening of the developed bone substitute material for histocompatibility and biological performance in terms of accelerated degradability and new bone formation at the implant site in rats. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

References

-Stravopoulos A, Sculean A, Bosshardt DD, Buser D, Klinge B. *Periodontol 2000*. 2015 Jun;68(1):55-65

-Renno AC, van de Watering FC, Nejadnik MR, Crovace MC, Zanotto ED, Wolke JG, Jansen JA, van den Beucken JJ. *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 5728-5739

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

- Bone defect surgery: bone substitute materials will be placed orthotopic (i.e. in the femora) and ectopic (i.e. subcutaneous) in healthy, skeletally mature rats under general anesthesia. A femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rats needed) and filled with one CaP-based bone substitute material per femur. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rats will receive painkillers. After the procedure, the rats will be housed in groups according to the housing standards. The rats will receive a normal diet and will have no special housing restrictions.
- Sacrifice: the rats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 2 or 6 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007).

For rapid screening of the biological performance of the bone substitute material, a small animal is the animal model of choice. Rats are the smallest and 'lowest' animal species suitable for bone regeneration studies. Furthermore, rats are ideal models to evaluate the performance of bone substitute materials for reasons of reliability, reproducibility, and accuracy in the obtained data.

A maximum of 12 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 6 rats are needed (i.e. 2 orthotopic and 2 ectopic implantation sites per rat) per implantation period. This means $12 \times 6 \times 2 = 144$ rats. A possible loss of up to 6 animals is taken into account. Therefore, 150 rats will be used in this part of the project. The number of rats in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rats will be skeletally mature Wistar rats from a EU-registered breeder.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	registered breeder	150	skeletally mature

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

C. Re-use

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: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment. All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo. Bilateral defects will be created to reduce the total number of laboratory animals needed. Both lines can be investigated at the same time in the same rat, i.e. both ectopic and orthotopic implants, diminishing the number of rats needed.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication will be given to the animals.

- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

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.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate.

An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.
To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

Its important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

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.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
8. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

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.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femora for histological analysis.

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.
- 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 2	Type of animal procedure Bone substitutes in diabetic and osteoporotic 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.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The *in vitro* liquid environment is not relatable to an *in vivo* environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies (containing mammals) are required to investigate biological performance. We intent to compare the biological performance of a well-known bone substitute material under treated compromised and healthy conditions to gain a better understanding about how diabetes mellitus and osteoporosis and the medication used as a treatment for the diseases affect bone regeneration in a rat bone defect model for non-critical size defects.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

Furthermore, expression of surface markers, gene expression and cellular behavior will be analyzed using *in vitro* culture (e.g. osteoclastic activity). The smaller the animal, the higher the metabolic rate. Therefore, the metabolic rate of the animal determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment. Shorter implantation periods (i.e. faster data sampling) are required in rats because of the fast healing (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 4 and 12 weeks, which allows comparison of the bone response in healthy conditions and in conditions of disease/medication in an early phase (up to 4 weeks

in rats) and a late phase (up to 12 weeks in rats) of material degradation and bone regeneration (Alghamdi, 2013; Al-Zube, 2009; Kuchler, 2014). It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. The intention of this study is to gain a better understanding about how diabetes and osteoporosis and the medication used as a treatment for the diseases affect bone regeneration, in comparison to bone regeneration in healthy conditions, using a legally marketed bone substitute.

References

-Alghamdi HS, van den Beucken JJ, Jansen JA. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Jun;20(6):493-505

-Al-Zube L, Breitbart EA, O'Connor JP, Parsons JR, Bradica G, Hart CE, Lin SS. *J Orthop Res*. 2009 Aug;27(8):1074-81

-Kuchler U, Keibl C, Fugl A, Schwarze UY, Tangl S, Agis H, Gruber R. *Clin Oral Implants Res*. 2015 May;26(5):485-91

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

· Induction of diabetes mellitus: diabetes mellitus will be induced by using streptozotocin and assess the condition by measuring blood glucose levels 1 week after induction (Fuegl et al., 2011). After confirmation of hyperglycemia, insulin will be given as a therapy.

· Induction of osteoporosis: osteoporotic conditions will be induced through orchidectomy and a special diet food, 6 weeks after orchidectomy (Alghamdi et al., 2014), the condition will be accessed using micro-CT scan and checking the BMD (bone mineral density). One week after bone defect surgery, an alendronate therapy will be installed.

The approach in both groups is based on previous research, in which diabetes mellitus and osteoporosis are successfully induced. Treatment is given to provide a situation as close to the situation in human patients.

· Bone defect surgery: when the compromised conditions are confirmed, a femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rats needed) and filled with bone substitute material. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rats will receive painkillers.

- Sacrifice: the rats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 4 or 12 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007). For rapid screening of the biological performance of the bone substitute material, a small animal is the animal model of choice. Rats are the smallest and 'lowest' animal species suitable for bone regeneration studies. Furthermore, rats are ideal models to evaluate the performance of bone substitute materials for reasons of reliability, reproducibility, and accuracy in the obtained data.

In this study there will be 3 groups:

1. Experimental group containing diabetic rats.
2. Experimental group containing osteoporotic rats. In both experimental groups the rats will be treated with the appropriate medication.
3. Control group containing healthy rats. This group is needed for comparison.

A maximum of 6 bone substitute materials will be analyzed in these groups (diabetic, osteoporotic and healthy rats). Per material a minimum of 6 rats are needed (i.e. 2 orthotopic implantation sites per rat) per implantation period. This means $6 \times 6 \times 2 = 72$ rats. A possible loss of up to 3

animals is taken into account. Therefore, 75 rats will be used in this part of the project. The number of rats in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rats will be skeletally mature Wistar rats from an EU-registered breeder. Wistar (Wister rats) is one of the most common strains used in studies for osteoporotic (orchidectomy) and diabetic (streptozotocin) induction.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat	registered breeder	75	skeletally mature

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: no replacement by lower animals or animal free techniques is available which mimic the biologic response requested for this experiment. However, the literature on the animal models of diabetes/osteoporosis is well accessible and the experimental protocols are well described; a high level of standardization and good comparison of experimental results between groups is possible.

Reduction: a sample size calculation was performed to provide the required number of animals to be used in this study. It is important to highlight that by using both legs we are also reducing the number of animals.

Refinement:

- Diabetes model: the model chosen is the quickest and less stressful diabetic induction model for the animal.
- Osteoporotic model: we will reduce the discomfort of invasive intervention (ORX and implantation) by performing the experiment under full anesthesia. Medication for pain will be given according to the anticipated pain after the intervention.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

A literature search conducted in PubMed showed no results for this specific procedure.

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?

F. Accommodation and care

No

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

No difference in housing, however a low calcium food pellet is used for the ORX group until the time of the second surgery (implantation procedures), whereas the other animals receive normal food. The low calcium food is needed to establish effectively the osteoporotic condition.

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.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After induction of diabetic/osteoporotic conditions and the femoral bone defect, the area will initially present some redness, swelling and a possible bruise may be visible. The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. For diabetic animals loss of weight can cause an adverse effect on welfare. For the diabetic rats, also an impaired wound healing can cause an adverse effect on welfare. An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. Another general adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

For diabetic animals loss of weight can cause an adverse effect on welfare. For the diabetic rats, also an impaired wound healing can cause an adverse effect on welfare. This will be watched carefully by the caretakers and researchers.

A low calcium diet is given to the Orchiectomy(ORX) group, which is not expected to influence animal behavior.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the rats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

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.

The animals will be observed on a daily basis and will be weighed on the day of diabetic/osteoporotic induction and bone defect surgery. Also at day 3 and 7 postoperatively/post induction, during the recovery period. Thereafter animals will be weighed weekly until the end of the experiment. In occurrence of unexpected clinical events, that cause distress and that are difficult or impossible to treat, they will be euthanized. The specific clinical signs include:

- Diabetic animals: rapid loss of weight (15-20%), prolonged diarrhea (3 days).
 - Further general HEP can be applied.
-

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

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).

All 3 groups are expected to present a *moderate level* of discomfort.

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 the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femur for histological and genetic analysis.

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.
- 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 3	Type of animal procedure Bone substitutes in healthy rabbits

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.

Bone regeneration depends on the interaction of bone tissue with the implanted bone substitute material. When the bone substitute material degrades, new bone can be formed at the implant site because of the resulting space. Complete bone regeneration is dependent on the degradation rate of the material (e.g. the speed at which the material degrades) and on the potential for new bone formation. Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate biological performance.

Bone substitute materials will be investigated through orthotopic (i.e. in the femora of the rabbits) implantation, leading to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

The metabolic rate of the animal, in this case the rabbit, determines the rate and amount of new bone formation, which, in turn, dictates the relevant time points for data collection during the course of the experiment (Stravopoulos et al., 2015). In this study, implantation periods will be 6 and 26 weeks, which allows comparison of the biological performance of the material in an early phase of material degradation and bone regeneration and on the long-term. In rabbits these are suitable implantation periods to have a reliable insight on the long-term performance of the bone substitute material (Rajesh et al., 1998; Choi et al., 2014), because 26 weeks is expected to coincide with complete material degradation and concomitant new bone formation at the implant site. It is important to first evaluate material degradation in an early phase: when degradation is not occurring, there

will be no resulting space for new bone formation and consequently there will be no interest in evaluating biological performance in a late phase. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

References

-Rajesh KS, Mohanty M, Varma BR, Bhat KM. *Indian J Dent Res.* 1998 Apr-Jun;9(2):59-65

-Choi S, Liu IL, Yamamoto K, Honnami M, Ohba S, Echigo R, Sakai T, Igawa K, Suzuki S, Nishimura R, Chung UI, Sasaki N, Mochizuki M. *J Artif Organs.* 2014 Dec;17(4):344-51

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

· Bone defect surgery: bone substitute materials will be placed orthotopic (i.e. in the femora) in healthy, skeletally mature rabbits under general anesthesia. A femoral bone defect is created in both femora (diminishing the number of rabbits needed) and filled with one CaP-based bone substitute material per femur. Both femora are operated on in one surgical session. During the surgery and post surgery, the rabbits will receive painkillers. After the procedure, the rabbits will be housed in groups according to the housing standards. The rabbits will receive a normal diet and will have no special housing restrictions.

· Sacrifice: the **rabbits** will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 6 or 26 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc, Nijmegen and based on the existing literature and the experience of our research group. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis.

Bilateral bone defects will be created per animal (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

B. The animals

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

When the developed, experimental bone substitute material is showing promising biological performance in rats, the goal is to evaluate the long-term performance of the material in terms of complete material degradation and concomitant new bone formation. A promising biological performance means: degradation of the implant material (i.e. CaP-based bone substitute material) and new bone formation at the site of the degraded implant. Evaluation by descriptive histology and quantitative histomorphometry on bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material. Of the 12 materials tested in rats, a maximum of 9 materials (including one legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) that show the most promising biological performance will be tested in rabbits. The number of 9 materials is a maximum; when a material is not showing promising biological performance in rats, this material in its current form will not be tested in rabbits.

For injecting a synthetic bone substitute material, a certain width of the defect is necessary. Consequently rabbits are the smallest animals or 'lowest animal species' suitable for injectable bone filler testing. The long-term follow-up time is based on the time point at which implantation time coincides with complete degradation of the material and new bone formation. In rabbits this is 26 weeks. Because of the difference in bone metabolic rate between smaller (rabbit) and larger animals, rabbits are more suitable for long-term follow-up testing of the performance of bone substitute materials, because the long-term follow-up time point in smaller animals will be ahead of the long-term follow-up time point in larger animals.

A maximum of 9 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 4 rabbits are needed (i.e. 2 orthotopic implantation sites per rabbit) per implantation period. This means $9 \times 4 \times 2 = 72$ rabbits. A possible loss of up to 3 animals is taken into account. Therefore, 75 rabbits will be used in this part of the project. The number of rabbits in this study is based on achievement of the study objectives with the lowest number of animals per group possible. The rabbits will be skeletally mature, female, New Zealand white rabbits. The choice of the sex of the rabbits is female. Female rabbits are preferred for housing reasons (less aggressive compared to male rabbits).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
New Zealand white rabbit	registered breeder	75	skeletally mature

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: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment.

All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo.

Bilateral defects will be created (i.e. both femora) to reduce the total number of laboratory animals needed.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized.

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication and an antibiotic drug will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

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.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rabbits. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized.

The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate.

An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling.

To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the rabbits. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the rabbits will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse effect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

It's important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

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.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
 2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
 3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
 4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
 5. Decrease in body weight of more than 20%.
 6. Severe self-mutilation due to distress.
 7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
 8. Severe decrease of motor function, causing distress.
-

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

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 the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the femora for histological analysis.

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.
- 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 4	Type of animal procedure Bone substitutes in healthy goats

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.

Bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate biological performance.

After showing promising results in the long-term follow-up study in rabbits, the most appealing bone substitute materials will be investigated in goats through orthotopic implantation in the femoral condyles and the iliac crests (bilaterally) and through filling of the sinus floor with the developed bone substitute material, leading to the objective of this study: to determine the biological performance of the developed bone substitute materials.

The primary outcome parameter of this study is:

- Bone response
 - -Evaluated by descriptive histology
 - Morphological description (i.e. tissue reaction against CaP-based bone substitute material)
 - -Evaluated by quantitative histomorphometry
 - The degradation of the synthetic bone substitute material
 - The formation of new bone at the implant site

In this study, the implantation period will be 12 weeks, which is a suitable implantation period for larger animals to evaluate material degradation and bone regeneration (Hoekstra et al., 2012). Evaluation of degradation of the material in an early phase is not beneficial, because degradation is already confirmed in the study with the rabbit animal model. Instead, sequential fluorochrome labeling will make it possible to visualize the dynamics of bone growth in time. Evaluation of bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of biological performance of the implanted CaP-based bone substitute material, making translation towards clinical application possible.

References

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

- Bone defect surgery: bone defects will be created and bone substitute materials will be placed orthotopic (femoral condyles, iliac crests and sinus floors) in skeletally adult goats under general anesthesia. All goats will undergo one surgical session. During surgery heart rate and the oxygen level in the blood of the goats will be monitored. During the surgery and post surgery, the goats will receive painkillers and an antibiotic drug. After the procedure, the goats will be housed according to the housing standards. Fluorochrome markers will be administered subcutaneously at 1, 3, 6 and 9 weeks post-surgery (Loozen et al., 2015; Hoekstra et al., 2012). To analyze auto-fluorescence after histological processing, one goat will be used as a control and will not receive the fluorochrome markers (Hoekstra et al., 2012).
- Sacrifice: the goats will be sacrificed at the indicated time points (i.e. after an implantation period of 12 weeks) in accordance with ISO standards and protocols of Radboudumc.

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

Sample size calculation was calculated in line with the requirements of the animal facility of Radboudumc, Nijmegen. Sample size is calculated in such a way that the study objectives can be achieved with the lowest number of animals possible. Calculation will be done with a power analysis. Multiple implantation sites will be used to decrease the amount of animals needed to obtain the project's objectives. The femoral condyle and iliac crest models allow 4 experimental bone substitute materials. The sinus floor elevation procedure will be carried out in a split mouth design, allowing direct comparison of 2 materials; the experimental bone substitute material with a legally marketed bone substitute material.

B. The animals

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

For determining what animal model to use in studies investigating bone implants, it is important to understand the specific bone characteristics, such as bone modeling and remodeling. Also the size of the animal must be considered to ensure that it is appropriate for the number and size of the implant chosen (Pearce et al., 2007). Making an increase in the size of the defects possible and providing an increase in similarity to the human bone model, goats are used to perform implantation of the most appealing synthetic bone substitute formulations orthotopically (i.e. femoral condyles, iliac crests and sinus floor elevation procedures). The goat is a suitable animal model for testing human implants and materials as they are considered to have a metabolic rate and bone-remodeling rate similar to that of humans (Anderson et al., 1999; Spaargaren, 1994). Bone healing capacity of goat bone is comparable with that of humans (Dai et al., 2005). The goat is also a suitable animal model because of the size and shape of the bones and similarity in loading properties. In rabbits this cannot be tested because of the differences in stance between the species (Pearce et al., 2007).

Of the 9 materials tested in rabbits, a maximum of 4 materials (including one legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) that show the most promising long-term performance in terms of complete implant degradation of the implant material (i.e. CaP-based bone substitute material) and new bone formation at the site of the degraded implant will be tested in goats. Evaluation by descriptive histology and quantitative histomorphometry on bone morphology, the amount of implant material that remained in situ / the amount of implant material that degraded and the amount of new formed bone will make it possible to obtain results in terms of long-term performance of the implanted CaP-based bone substitute material.

A maximum of 4 materials (CaP-based bone substitute materials (experimental group) and a legally marketed bone substitute as a comparison (control group)) will be analyzed. Per material a minimum of 8 goats are needed. This means $4 \times 8 = 32$ goats. The number of goats in this study is based on achievement of the study objectives (to demonstrate a difference between the groups) with the lowest number of animals per group possible. The goats will be skeletally mature.

The same goat will be used for a bilateral sinus elevation procedure as well as for implantation in the femora and iliac crests bilaterally:

- The sinus floor elevation procedure will be carried out in a split-model design that allows direct comparison of the most appealing developed, experimental bone substitute material with a legally marketed bone substitute material. This procedure therefore only allows 2 bone substitute materials, one at each site. Each developed material should at least be tested in a sinus floor elevation procedure (i.e. similarity to the clinical situation in humans).
- The femoral condyle and iliac crest models allow 4 experimental materials. These implantation sites are used because of the possibility to

compare biological performance of the materials and bone response between implantation sites (i.e. different bones) and to diminish the number of goats needed (The goat animal model allows more materials to be tested in one goat) All materials will be implanted in one surgical session. As mentioned above, the implantation sites are chosen because of the similarity to the clinical situation in humans (i.e. sinus elevation procedures) and because of the possibility to compare biological performance of the materials and bone response between implantation sites (i.e. different bones). Other important factors to choose these implantation sites are:

- Easy accessibility of corticocancellous bone in these bones
- The femoral condyles as a constant factor (i.e. used in the rat and rabbit animal model)
- Similarity of the iliac crest bone model to the sinus floor elevation model, because of the two cortical layers of bone that enclose the corticocancellous bone.

This study will show the in vivo performance of the bone substitute materials in terms of material degradation and the formation of new bone as a last stage of pre-clinical research, in a bone model most comparable to human. When new bone formation can be demonstrated in this pre-clinical study, further clinical research can be performed to provide an off-the-shelf bone substitute material for clinical practice.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
goat	registered breeder	32	skeletally mature

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: bone ingrowth can only be assessed in a living organism. The in vitro liquid environment is not relatable to an in vivo environment, in which body fluids, containing among others proteins, and cellular systems by cell-mediated processes will influence degradation of the bone substitute material and new bone formation. Animal studies are required to investigate bone ingrowth and biological performance.

Reduction: a power analysis makes sure the number of animals will be the minimum to still have a reliable experiment.

All developed synthetic bone substitute materials are tested in vitro on handling properties, i.e. ability to set, cohesion and injectability of the material before they will be tested in vivo. Multiple defects (i.e. split-mouth design and both femora and both iliac crests) will be created per animal to reduce the total number of laboratory animals needed.

The same goat will be used for implantation in the femora and iliac crests as well as for a sinus elevation procedure.

Refinement: this animal study will be performed with the lowest possible discomfort to the animals. Surgery will be performed under general anesthesia according to the protocol approved by the Central Animal Laboratory. At the end of surgery and post surgery, the animals will receive necessary painkillers. Housing and all living standards of the animals will be empathized

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

- The surgical procedures will be performed under general anesthesia and post-operative pain control medication and an antibiotic drug will be given to the animals.
- The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.
- Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

A search on PubMed will be performed for every developed bone substitute material, to make sure there will be no duplication.

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.

Surgeries will be performed under general anesthesia. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the goats. To relieve the pain originating from the surgical wound, the surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, the animals will experience less pain, the wound will heal faster and complications such as dehiscence of the wound will be minimized. The sutures that will be used are running sutures that are placed intracutaneously. This way the animals will have the least annoyance of the sutures. The sutures are resorbable, so there is no need to remove them.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The expected level of discomfort for the animals in this experiment is presumed to be moderate. An adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are placed intracutaneously. This way the goats will have the least annoyance of the sutures. Another adverse effect can be post-anesthetic discomfort. Post-anesthetic discomfort can be caused by the anesthetics used, and can consist of nausea and dizziness. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day.

Explain why these effects may emerge.

After bone defect surgery the healing process will start, which means that new bone will be formed. The normal pathway of this process is inflammation/repair/remodeling. To avoid discomfort, anti-inflammatory and analgesic medication will be given to the goats. No adverse effects from this medication is expected.

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

Animals will be looked after by the researcher and the bio-technicians to detect any signs of wound healing problems, unexpected increase of distress or an increased level of discomfort.

The surgical site is specifically chosen to have no stress on the wound if the animal is awake; therefore, no undesirable effects are expected.

An general adverse effect can be biting the surgery site/sutures. This will be prevented as much as possible by using running sutures that are place intracutaneously. This way the goats will have the least annoyance of the sutures.

Another general adverse affect can be post-anesthetic discomfort. This discomfort is most likely to occur on the day of surgery and will generally not last longer than one day. The anesthesia has been used for numerous experiments and we expect no unpredictable distress after the intervention.

Its important to highlight that this surgical procedure is performed commonly by our department people and that we have used the same animal model to study several other materials during the past few years.

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.

General condition (including cardiopulmonary condition, weight, hydration status, body temperature), motor function and wound healing (including possible complications, for example infection at the surgical site, formation of an hematoma or active bleeding, dehiscence) will be monitored.

If the animals show one or more of the below mentioned signs, euthanasia will be applied prematurely:

1. Cardiopulmonary problems, causing respiratory difficulties.
2. Considerable blood loss, due to bleeding at the surgical site as a complication of surgery or due to unforeseen internal blood loss, causing anemia or hypovolemic shock.
3. Persistent low body temperature, which could not be reversed, causing discomfort or problems in blood clotting and therefore inducing possible bleedings.
4. Clear signs of dehydration due to lack of intake of water or excessive loss of body fluids due to vomiting or diarrhea, causing discomfort or hypovolemic shock.
5. Decrease in body weight of more than 20%.
6. Severe self-mutilation due to distress.
7. Severe infections at the surgical site as a complication of surgery.
8. Severe decrease of motor function, causing distress.

Indicate the likely incidence.

The animal procedures are not expected to cause any life-threatening problem. This animal model has been used in several other studies related to bone regeneration and performed by our department people.

K. Classification of severity of procedures

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

The expected level of discomfort is moderate. This level of discomfort is most likely to occur the first day after surgery due to anesthesia.

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.

After the experimental time the animals will need to be sacrificed to retrieve the iliac crests and femora for histological analysis.

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 2015-0036
2. Titel van het project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
3. Titel van de NTS: Botvervangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
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: 27-03-2015
 - in vergadering besproken: 13-04-2015, 04-05-2015 en 07-07-2015
 - anderszins behandeld: nvt
 - termijnonderbrekingen van 20-04-2015 tot 23-04-2015, van 11-05-2015 tot 25-06-2015, en van 13-07-2015 tot 27-07-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: n.v.t.
 - aanpassing aanvraag: 27-07-2015
 - advies aan CCD: 18-08-2015
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)
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 20-04-2015
 - Strekking van de vragen:
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - -1.1 Diabetes en osteoporose komen wel voor in de titel, maar worden niet genoemd in de samenvatting. De commissie verzoekt de onderzoekers dit aan te passen.
 - -3.3 De geschatte aantallen komen niet overeen met de aantallen in de Description of animal procedures. De onderzoekers worden verzocht deze aantallen in overeenstemming te brengen.
 - - De onderzoekers worden verzocht de NTS in te korten tot ongeveer 500 woorden, conform de richtlijnen van de CCD.
 - **Project Proposal:**

- - 3.1. De huidige beschrijving van de wetenschappelijke achtergrond voldoet niet aan de richtlijnen daarvoor in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag. De commissie verzoekt u de beschrijving van de achtergrond in overeenstemming te brengen met genoemde toelichting, en meer aandacht te besteden aan de internationale stand van het onderzoek in dit vakgebied, de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose, en de aanleiding tot dit onderzoek. De beschreven hoofddoelstelling volgt nu niet logischerwijs uit de beschreven wetenschappelijke achtergrond.
- -3.4.2 Waarom willen de onderzoekers de botvervangende materialen in konijnen testen? Zij schrijven zelf dat het konijn als modeldier voor de mens niet zo geschikt is, terwijl geiten dat wel zijn. Kan het onderzoek niet beperkt worden tot rat en geit?
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. De onderbouwing voor het gebruik van de voorgestelde modellen en primaire uitkomstparameters ontbreekt, en de proeven zijn niet in voldoende detail beschreven. Het is bijvoorbeeld niet duidelijk op welke tijdstippen de onderzoekers de botvorming zullen bestuderen en waarom zij voor deze tijdstippen kiezen. Verwachten de onderzoekers dat de gekozen primaire uitkomstparameters in proef 3 afwijken in de genoemde ziektemodellen en zo ja waarop is die verwachting gebaseerd? Waarom is long-term follow-up niet belangrijk in de modellen voor diabetes en osteoporose? Waarom willen de onderzoekers zoveel laesies in geiten aanbrengen? Zij worden verzocht dit onderdeel van dierproef 1-6 in overeenstemming te brengen met de beschrijving hiervan in de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- - Dierproef 1-6, B. De onderbouwing van de aantallen dieren aan de hand van een globale omschrijving van de onderzoeksgroepen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. Indien hiervoor dezelfde dieren worden gebruikt, verzoekt de commissie de onderzoekers dit in één dierproef te beschrijven of duidelijker aan te geven dat het dezelfde dieren betreft (zie ook de vraag over de niet-technische samenvatting punt 3.3).
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- -1.1 *Dit is aangepast in de niet technische samenvatting en blauw gemarkeerd.*
- -3.3 *Dit is aangepast zodanig dat de aantallen in de Description of animal procedures en in de NTS overeenkomen.*
- *-De NTS is sterk ingekort.*
- **Project Proposal:**
- -3.1. *De beschrijving van de achtergrond is in overeenstemming gebracht met de toelichting, waarbij aandacht is besteed aan de genoemde aspecten. De toegevoegde beschrijving is blauw gemarkeerd.*
- -3.4.2 *Konijnen zijn geschikt om defecten te creëren van een zodanige grootte, dat het botvervangende materiaal geïnjecteerd kan worden in het botdefect. Dit is niet mogelijk in de botten van ratten. Het konijn is het kleinste dier geschikt voor onderzoek naar injecteerbare botvervangende materialen. Het konijn is eveneens zeer geschikt voor onderzoek naar de lange termijn prestaties van het botvervangende materiaal (tot 26 weken, waarbij volledige*

degradatie overeenkomt met deze implantatietijd) op het gebied van degradatie van het materiaal en op het gebied van ondersteuning van de ontwikkeling van nieuw bot ter plaatse. Wanneer kan worden aangetoond dat het materiaal op de lange termijn goed presteert, kan het materiaal getest worden in geiten, waarbij een betere vergelijking gemaakt kan worden met het gedrag in menselijk bot, vanwege de overeenkomsten in mechanische belasting en de overeenkomsten in botontwikkelingen en botgenezing. Vanwege het botmetabolisme van de geit, vele gelijkenissen vertonend met dat van de mens, is de geit minder geschikt dan het konijn om de prestaties van het materiaal op lange termijn te testen. Het botmetabolisme van het konijn is namelijk veel sneller dan dat van de geit, waardoor volledige vervanging van het botvervangende materiaal door bot al bij 26 weken kan worden gezien, in tegenstelling tot bij geiten.

- *Bovenstaande is opgenomen in de project proposal punt 3.4.2 en blauw gemarkeerd.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A *De opmerkingen zijn verwerkt en blauw gemarkeerd.*
- - Dierproef 1-6, B. *De omschrijving van de experimentele groepen is toegevoegd en blauw gemarkeerd.*
- -Dierproef 1 en 2, en dierproef 5 en 6. *Voor de dierproeven met betrekking tot ectopische en orthotopische implantatie in ratten worden dezelfde dieren gebruikt. Deze dierproeven zijn nu samengevoegd tot één dierproef. Voor de dierproeven met betrekking tot orthotopische implantatie en sinusbodemelevatie procedures worden eveneens dezelfde dieren (geiten) gebruikt. Deze dierproeven zijn eveneens samengevoegd tot één dierproef.*
-
- Datum: 11-05-2015
- Strekking van de vragen:
- **Niet-technische samenvatting:**
- 3.3 De aantallen in de niet-technische samenvatting komen nog steeds niet overeen met de aantallen zoals genoemd in de tabellen in de beschrijving van de dierproeven (een totaal van 400 ratten). De onderzoekers worden nogmaals verzocht deze aantallen in overeenstemming met elkaar te brengen.
- **Project Proposal:**
- 3.1 De onderzoekers hebben nog niet aannemelijk gemaakt dat de botgenezing in behandelde patiënten met diabetes of osteoporose onvoldoende is. Ook ontbreekt een gedegen overzicht, met referenties, van de huidige stand van zaken in het internationale onderzoek naar botvervangende materialen en een onderbouwing waarom een combinatie van bestaande materialen met juist de andere genoemden kansrijk zou zijn. De onderzoekers worden nogmaals verzocht dit aan te passen conform de toelichting op de formulieren voor een projectaanvraag.
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. Het is nog steeds niet duidelijk op welke tijdstippen de botvorming bestudeerd zal worden en waarom de onderzoekers voor deze tijdstippen kiezen. Ook hebben zij niet uitgelegd waarom zij de long-term follow-up niet bestuderen in de modellen voor diabetes en osteoporose. De aantallen dieren zijn nog steeds niet voldoende onderbouwd aan de hand van een experimenteel design. Ook is nog steeds niet toegelicht

waarom de onderzoekers zoveel laesies in geiten willen aanbrengen. Zij worden nogmaals verzocht deze informatie toe te voegen.

- -Dierproef 1-6, B. De aantallen dieren in de tabel komen niet overeen met de aantallen dieren in de tekst.
- Datum antwoord: 23-04-2015
- Strekking van de antwoorden:
- **Niet-technische samenvatting:**
- *3.3 Reactie: de aantallen zijn aangepast zodat deze door de gehele projectaanvraag eensluidend zijn. Het gaat hierbij om in totaal 225 ratten, waarvan 75 ratten voor onderzoek naar de invloed van diabetes/osteoporose op botgenezing bij gebruik van botvervangend materiaal en 150 ratten voor onderzoek naar de prestaties van nieuw ontwikkeld, experimenteel botvervangend materiaal in gezonde condities. Voorts omvat de projectaanvraag 100 konijnen en 32 geiten voor evaluatie van botregeneratie in alternatieve diermodellen.*
- **Project Proposal:**
- *3.1 Reactie: de achtergrond informatie (3.1) is aangepast en de aanpassingen zijn blauw gemarkeerd, waarbij middels referenties het feit dat botgenezing in patiënten met diabetes of osteoporose afwijkend is, wordt onderbouwd. Tevens is de huidige stand van zaken in (internationaal) onderzoek naar botvervangende materialen toegevoegd, waaruit blijkt dat door de combinatie van geïjkt biomateriaal voor botvervangende materialen (i.e. calciumfosfaat) met snel degraderende componenten (zgn. porogens o.b.v. bijvoorbeeld polymeren) doeltreffend is voor de optimalisatie van botregeneratie.*
- **Description of Animal Procedures:**
- - Dierproef 1-6, A. *Reactie: de tijdstippen waarop de botvorming bestudeerd zal worden, zijn voor elk specifiek projectonderdeel toegevoegd in de beschrijving van de dierproeven alsook waarom voor deze tijdstippen gekozen is. Voorts zijn de aantallen dieren onderbouwd en is toegelicht wat het doel van de experimenten met geiten is.*
- -Dierproef 1-6, B. *Reactie: de aantallen dieren in de tabel en tekst zijn aangepast zodat zij overeenkomen.*
-
- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP3, onderdeel A tweede vraag: In de laatste zin is sprake van ratten terwijl konijnen bedoeld worden. De onderzoekers worden verzocht dit te corrigeren.
- -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: De onderzoekers willen alle 12 materialen die getest worden in ratten, daarna ook testen in konijnen. Is het niet de bedoeling dat in de sequentie rat>konijn>geit steeds een selectie van de beste materialen plaatsvindt? Dit wordt wel gesuggereerd onder 3.4.3 van het Project proposal. De onderzoekers worden verzocht een selectie te maken en aan te geven op grond waarvan zij materialen selecteren voor deze dierproef, of aannemelijk te maken dat alle botvervangende materialen in konijnen getest dienen te worden.
- Datum antwoord: 27-07-2015
- Strekking van de antwoorden:

- **Description of Animal Procedures:**

- -DAP3, onderdeel A tweede vraag: *Reactie: bovenstaande is gecorrigeerd.*
- -DAP 1,3 en 4, onderdeel B: *Reactie: een selectie van de beste materialen is toegevoegd en tevens is aangegeven op grond waarvan de materialen geselecteerd worden voor de dierproeven. De tekst waarin dit beschreven wordt is vetgedrukt.*

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- 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 'to develop an off-the-shelf synthetic CaP-based bone substitute material for clinical application in bone regenerative treatments for patients in healthy conditions as well as conditions in which bone healing is impaired (i.e. osteoporotic and diabetic conditions)'. Grote botdefecten genezen vaak niet spontaan. Het defect dient dan te worden "opgevuld" om te zorgen dat het bot weer herstelt of aan elkaar groeit. Het verkrijgen van goede synthetische botvervangende materialen die voor dit doel kunnen worden gebruikt is van belang, omdat zij het gebruik van allogeen bot of autoloog bot voor de behandeling van botdefecten kunnen voorkomen. Zowel het gebruik van donorbot, als het gebruik van eigen bot van de patiënt heeft belangrijke nadelen. Voor het gebruik van botmateriaal van de patiënt zelf is bijvoorbeeld een belastende operatie nodig (in feite wordt dan elders in het lichaam een botdefect gecreëerd). Voor synthetische botvervangende materialen is het van belang dat ze biocompatibel zijn, met de juiste snelheid worden afgebroken en tegelijk de vorming van nieuw eigen bot stimuleren. Dit project zal duidelijk maken of het nieuw ontwikkelde botvervangende materiaal een verbetering ten opzichte van het huidige synthetische botvervangende materiaal op basis van CaP laat zien voor wat betreft gecontroleerde degradatie en stimulatie van botvorming bij ratten, konijnen en geiten. De experimenten zullen een indicatie geven of dit nieuwe materiaal ook een verbetering zal betekenen op deze gebieden wanneer het wordt gebruikt bij patiënten met osteoporose of diabetes bij wie het botvormingsproces minder goed verloopt als gevolg van hun ziekte.

Bovendien wordt een indruk verkregen van de lange termijn effecten van toepassing van dit materiaal. Een dergelijk synthetisch botvervangend materiaal zou gebruikt kunnen worden bij patiënten met botdefecten in tanden, kaken, ruggenwervels en het bewegingsapparaat. Het beschikbaar komen van verbeterde materialen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De proeven in de verschillende diersoorten volgen logisch op elkaar en geven antwoorden op verschillende typen vragen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken welke factoren van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP belangrijk zijn voor de gewenste biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming, en welk effect de toevoeging van antibiotica en bioorganische stoffen op deze parameters heeft. Het onderzoek geeft een indicatie van de mogelijkheid om dit materiaal toe te passen bij de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose.
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. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. Bij een aantal dieren zal bovendien osteoporose of diabetes worden geïnduceerd, waarna ze adequate behandeling hiervan zullen ontvangen. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en orchidectomie in als matig, en de behandeling van osteoporose en de inductie en behandeling van diabetes als licht. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd, voor de resterende onderzoeksvragen is onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden een aantal botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. Op grond van de resultaten bij ratten worden een aantal materialen getest in konijnen. Alvorens experimenten met geiten plaatsvinden zal weer een selectie gemaakt worden van te testen materialen op grond van de resultaten bij konijnen. De volgorde van de experimenten en de noodzaak om in alle drie de diersoorten experimenten te verrichten, is goed beargumenteerd. Het maximale aantal te gebruiken dieren 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 statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 225 ratten, 75 konijnen en 32 geiten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie, en adequate behandeling van diabetes en osteoporose. 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 worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de vraag hoe de samenstelling en structuur van synthetisch botvervangend materiaal op basis van CaP, en de toevoeging van antibiotica en bioinorganische stoffen daaraan, eigenschappen als biocompatibiliteit, degradatiesnelheid en botvorming beïnvloeden. De resultaten geven onder andere een indicatie of deze materialen ook met succes kunnen worden toegepast voor de behandeling van botdefecten bij mensen met diabetes of osteoporose. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een verbeterd synthetisch botvervangend materiaal. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, gezien de toename van het aantal ouderen in onze maatschappij en de nadelen van het nu beschikbare materiaal voor met name patiënten met osteoporose en diabetes.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en in sommige gevallen het induceren en behandelen van diabetes of osteoporose. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

Radboud Universiteit Nijmegen

██████████

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

AVD103002015227

Bijlagen

2

Datum 27-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015227. 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. 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 verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantie voor Dierenwelzijn
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee
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: 25 september 2015
Geplande einddatum: 25 september 2020
Titel project: Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes
Titel niet-technische samenvatting: Botvangende materialen in gezondheid, botontkalking en suikerziekte
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
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: Instantie voor Dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
p/a [REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN
[POSTNET]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227
Bijlagen
2

Datum 27-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 27 augustus 2015
Vervaldatum: 26 september 2015
Factuurnummer: 201570227

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015227	€ 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 6 oktober 2015 17:12
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD103002015227

Beste [Redacted]

Hierbij de antwoorden van de onderzoekster m.b.t. dit project.

Met vriendelijke groet,
[Redacted]

Geachte mevrouw [Redacted],

Hierbij doe ik u de antwoorden op de vragen toekomen m.b.t. projectvoorstel AVD103002015227 getiteld: "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes":

1. In de experimentele opzet beschrijft u dat de te testen bone substitutes simultaan in gezonde ratten en in ratten met een ziektemodel getest worden (bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2). Uit uw beschrijving maken wij op dat alleen die bot vervangende middelen getest worden in konijnen en geiten wanneer die in beide rattenmodellen veelbelovende resultaten geven. Kunt u bevestigen of dit de juiste interpretatie is?

Antwoord vraag 1: deze interpretatie is grotendeels juist. Wanneer de te testen botvervangende materialen in gezonde ratten veelbelovende resultaten geven, zullen deze botvervangende materialen verder getest worden in gezonde konijnen en geiten. Alleen die botvervangende materialen die een goed resultaat geven in gezonde ratten zullen verder worden getest in gezonde konijnen en geiten.

In de ratten met een ziektemodel wordt de invloed van de ziekte getest op de biologische prestatie van botvervangend materiaal. Het botvervangend materiaal wordt niet getest in konijnen of geiten met een ziektemodel. Met andere woorden: voor het ziektemodel worden slechts ratten gebruikt.

2. In de bijlages beschrijving dierproeven geeft u alleen in bijlage 3.4.4.3 aan dat u vrouwelijke konijnen wilt inzetten. Kunt u voor de ratten en geiten uit de andere bijlages ook aangeven welk geslacht dieren u wilt inzetten en als u de voorkeur heeft voor 1 geslacht kunt u dit dan toelichten?

Antwoord vraag 2: alle ratten die worden ingezet zijn mannelijk. Mannelijke ratten hebben het voordeel substantieel grotere femur te hebben dan vrouwelijke ratten wat noodzakelijk is voor het creëren van de gewenste botdefecten in de femora (Alghamdi H.S., Tissue Engineering Part C Methods, 2013) Alle geiten die worden ingezet zijn vrouwelijk. Geiten komen van een gangbare boerderij waar zij worden ingezet voor melkproductie. Wanneer zij niet toereikend zijn voor melkproductie (te lage melkproductie) worden zij ingezet in dierexperimenteel onderzoek. Grote hoeveelheden bokken worden niet gehouden op een boerderij, aangezien zij geen melk produceren.

Hartelijk dank voor het in behandeling nemen van ons projectvoorstel,

Met vriendelijke groet,
[Redacted]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: maandag 5 oktober 2015 16:20
Aan: [Redacted]
CC: Postbus instantie voor dierenwelzijn; [Redacted]
Onderwerp: RE: vraag bij de behandeling van AVD103002015227



Centrale Commissie Dierproeven



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
Instantie voor Dierenwelzijn Radboud
Tav. [REDACTED]
Postbus 9101
6500 HB 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
AVD103002015227

Uw referentie

14 OKT. 2015

Datum
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen
1

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015227. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 6 oktober 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD of u de keuze voor mannelijk of vrouwelijke dieren nader kon motiveren.

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 tweede voorwaarde is een algemene voorwaarde die wordt gesteld bij projecten met een 5-jarige looptijd, om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" starten. De vergunning wordt afgegeven van 15 oktober 2015 tot en met 25 september 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 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. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD stelt aanvullend een paar algemene voorwaarden.

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.

Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

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

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

Meer informatie

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

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: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: postbus 91025
Postcode en woonplaats: 6525 EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 oktober 2015 tot en met 25 september 2020, voor het project "Bone substitutes in health, osteoporosis and diabetes" met aanvraagnummer AVD103002015227, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker in opleiding. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op dd 18 augustus 2015, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 6 oktober 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Bone substitutes in healthy rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	150	Matig / moderate
Bone substitutes in diabetic and osteoporotic rats	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Wistar	75	Matig / moderate
Bone substitutes in healthy rabbits	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / New Zealand White	75	Matig / moderate
Bone substitutes in healthy goats	Geiten (<i>Capra aegagrus hircus</i>) / niet benoemd	32	Matig / moderate

Voorwaarden

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat beslissingen over go/no go momenten worden genomen met instemming van 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
AVD103002015227

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

Datum
14 oktober 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015227

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.



Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 14 oktober 2015 14:32
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: Beschikking AVD103002015227
Bijlagen: Beschikking 227.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

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
	NTS2015228								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	DEC-advies				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Projectvoorstel				x		x	x	
5	Bijlagen dierproeven				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Factuurinformatie				x		x		
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



27 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 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? <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 10300 <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	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. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	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	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Postdoc
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker in opleiding
		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 Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 5 . 0 9 . 2 0 1 5
- Einddatum 2 5 . 0 9 . 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe inzichten in en behandeling van cocaine en methamphetamine verslaving
- 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, factuurinformatie


6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

Functie Instantie voor dierenwelzijn

Plaats Nijmegen

Datum 25 - 08 - 2015

Handtekening 

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 'to reveal how s ██████████ ██████████ contribute to the neurochemical and drug-taking effects of cocaine and methamphetamine. And in addition to test the potential therapeutic effects of a number of treatments ██████████'. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Het onderzoek betreft weliswaar een risicovolle hypothese, maar daarbij dient in aanmerking te worden genomen dat dit bij fundamenteel onderzoek niet ongebruikelijk is en dat de kans op bruikbare uitkomsten, ██████████ ██████████, zeer reëel is. De maatschappelijke problematiek van verslaving en de behoefte aan gerichte therapieën die aangrijpen op het mechanisme van de verslaving, vertegenwoordigen eveneens een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn wetenschappelijk verantwoord en kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC acht deze onderzoeksgroep zeer competent op dit onderzoeksgebied. De gekozen aanpak leidt in elk geval tot meer inzicht in de werking van psychostimulantia.
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 voor de meeste dieren realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door het in vivo meten van serotonine in bepaalde hersengebieden, het induceren van verslaving aan cocaïne of methamphetamine en de handelingen die nodig zijn om zelftoediening van verslavende stoffen mogelijk te maken. De DEC schat het ongerief als gevolg van de injecties, de benodigde operaties, de blootstelling aan psychostimulantia gedurende korte of langere tijd en onthouding hiervan, en het ondergaan van een gedwongen zwemtest waarin immobiliteit wordt gemeten in als matig. Het ongerief voor de dieren die beide operaties ondergaan wordt ingeschat als ernstig. De meeste dieren ondergaan een gedwongen zwemtest, hetgeen in dit geval matig ongerief veroorzaakt. De DEC is op de hoogte van BIJLAGE VIII bij de Richtlijn 2010/63, waarin sprake is van ernstig ongerief bij gedwongen zwemtests, en meent dat de Nederlandse frasering "test met gedwongen zwemsessies of oefeningen met uitputting als eindpunt" berust op een foutieve vertaling van "forced swim or exercise tests with exhaustion as the end-point". Uit de Engelse versie blijkt dat het er om gaat dat een gedwongen zwemtest **met uitputting als eindpunt**, dient te worden ingeschaald als ernstig ongerief. De DEC heeft uitvoerig gediscussieerd over de juiste inschaling van het ongerief veroorzaakt door gedwongen zwemsessies, en heeft advies ingewonnen bij een proefdierdeskundige (die de testen in het verleden heeft geobserveerd) omtrent de inschaling

van het ongerief van de zwemtesten zoals beschreven in deze vergunningaanvraag. Zonder de deskundigheid van de mensen die die lijst met voorbeelden hebben opgesteld in twijfel te willen trekken, is de DEC van mening dat niet voor elke diersoort en niet voor elke variant van de test gesteld kan worden dat een forced swim test tot uitputting leidt. Er is in de onderhavige test geen sprake van dat men het tijdstip waarop daadwerkelijk uitputting optreedt (als uitleesparameter) wil vaststellen. Het blootstellen van de rat aan de gedwongen zwemtest zoals beschreven in deze vergunningaanvraag (1^e dag 15 minuten, 2^e dag 5 minuten zwemmen) kan als matig ongerief worden ingeschat, omdat mag worden aangenomen dat een rat 15 minuten kan zwemmen zonder uitgeput te raken. Het cumulatief ongerief voor het beschreven project is daarom terecht ingeschat als ernstig voor de dieren die twee operaties ondergaan (ongeveer 20% van de dieren) en matig voor de rest van de dieren. De commissie is van mening dat het cumulatief ongerief voor de dieren die eenmaal zijn geopereerd en herhaaldelijke injecties ontvangen, door de onderzoekers ten onrechte is ingeschat op ernstig. Zij is van mening dat het cumulatief ongerief voor deze dieren matig is.

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.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. De verschillende experimenten in het project volgen logisch op elkaar en een volgend experiment wordt pas gestart indien de resultaten van het voorafgaande experiment daartoe aanleiding geven. Het aantal benodigde dieren wordt geoptimaliseerd door resultaten uit voorgaande experimenten te gebruiken bij de opzet van de vervolgexperimenten. Het maximale aantal te gebruiken dieren 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 statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 2080 mannelijke Wistar ratten.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie. De beschreven zwemtest is noodzakelijk voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag en leidt in deze vorm tot niet meer dan matig ongerief. 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 worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van verslaving(sgedrag). Het is aannemelijk dat die inzichten kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van therapeutische interventies bij verslaving. Het belang van meer inzicht in het ontstaan van verslaving en het beschikbaar komen van meer therapeutische opties acht de DEC substantieel, gezien de omvang van de maatschappelijke en individuele problematiek.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat 80% van dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief en 20% van de dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het *in vivo* meten van serotonineconcentraties in bepaalde hersengebieden, het induceren van cocaïne of methamphetamine verslaving en de handelingen die nodig zijn om zelftoediening van verslavende stoffen mogelijk te maken. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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 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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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.

Acute administration of cocaine and methamphetamine is known to drastically increase the extracellular levels of the monoamine serotonin in the brain [REDACTED]. In-vitro studies have shown that cocaine may inhibit the neuronal re-uptake of monoamines by blocking plasmalemmal serotonin re-uptake transporters. However, on the basis of a series of in-vivo studies we have recently proposed that cocaine may also [REDACTED] monoaminergic storage vesicles ([REDACTED]). To what extent this novel [REDACTED] action of psychostimulants is depending on the [REDACTED] is currently unknown.

- In the **first experiment** we would like to investigate whether cocaine and methamphetamine are able to increase the extracellular levels of serotonin in the central amygdala of rats [REDACTED]

- In the **second experiment** we would like to establish whether cocaine and methamphetamine are able to [REDACTED] of the central amygdala in our [REDACTED] rats.

Cocaine and methamphetamine are highly addictive and have repeatedly been shown to result in voluntary self-administration in rats ([REDACTED]). Rats that are exposed to short (1h) daily sessions of cocaine or methamphetamine self-administration are marked by a moderate and stable psychostimulant intake, whereas the psychostimulant intake in rats that are exposed to long (6h) daily sessions of cocaine or methamphetamine self-administration has been found to strongly increase ([REDACTED]). This 'long access induced escalation of the drug intake' is generally accepted to model the transition from 'normal' to 'compulsive' drug use observed in human addicts.

In human addicts a genetic deletion of [REDACTED] has been found to increase the self-administration of psychostimulants ([REDACTED]). Interestingly, an increase of the short access psychostimulant intake has also been found in our [REDACTED] rats

([REDACTED]). Given the previously reported action of psychostimulants on the re-uptake of serotonin ([REDACTED]), [REDACTED] is also expected to affect the long access drug intake. The proposed action of cocaine and methamphetamine on the [REDACTED] ([REDACTED]), suggests that [REDACTED] may also lead to changes in the short and/or long access intake of these drugs.

- In the **third experiment** we would like to study cocaine and methamphetamine self-administration in [REDACTED] rats under both short and long access conditions.

At this point we don't know whether the increased psychostimulant intake in subjects with a [REDACTED] s due to a [REDACTED] [REDACTED] during adulthood or during development. This information is vital to establish when during life future serotonergic treatment strategies should be applied (see experiment 6 below).

- In the **fourth experiment** we would like to study cocaine and methamphetamine self-administration under short and long access conditions in rats in which [REDACTED] only during adulthood. The psychostimulant intake of these commercially available so called [REDACTED] ([REDACTED]) will be compared to the psychostimulant intake of our own [REDACTED] , in which [REDACTED] during their whole life (see experiment 3).

Serotonergic neurons are known to arise either in the dorsal or median raphe nuclei. At this point it is unknown which of these brain regions mediates the increased psychostimulant intake in subjects with [REDACTED] . However, preliminary results have shown that [REDACTED] in neurons arising from the dorsal, but not the median, raphe increase the long access intake of cocaine ([REDACTED]).

- In the **fifth experiment** we would like to stimulate or inhibit the serotonergic neurons of the dorsal raphe of adult [REDACTED] rats to investigate whether [REDACTED] in the neurons arising in this brain region contributes to cocaine and methamphetamine self-administration under both short and long access conditions. The type of [REDACTED] animals to be used in this experiment (constitutive or conditional) depends on the results of experiment 4 ([REDACTED]). The serotonergic neurons of the dorsal raphe are stimulated or inhibited using optogenetic techniques in collaboration with [REDACTED] . In case optogenetic manipulation of the serotonergic neurons of the dorsal raphe does not alter psychostimulant intake, a new DEC proposal will be submitted seeking permission to test the effects of the optogenetic manipulation of the median raphe neurons of our rats.

The previously reported finding that [REDACTED] changes psychostimulant self-administration (see above) indicates that drugs that alter extracellular serotonin levels may potentially have therapeutic effects in the treatment of both the normal and the compulsive intake of cocaine and methamphetamine (see also: [REDACTED]).

- In the **sixth experiment** we would like to test how changing the extracellular levels of serotonin alters cocaine self-administration under short and long access conditions in both [REDACTED] rats. Given that changing extracellular serotonin may have different effects during development versus adulthood (see experiment 4), we aim to expose our rats to the potentially therapeutic drugs directly after birth or during the self-administration experiment that takes place at adulthood. The type of [REDACTED] animals to be used in this experiment ([REDACTED]) depends on the results of experiment 4 ([REDACTED]).

Exposure to various changes in the environment during development has been found to alter the central levels of serotonin as well as psychostimulant intake (for review: [REDACTED]). This suggests that the serotonergic make-up and reactivity of the brain of our [REDACTED] rats makes these animals more susceptible to the potentially beneficial effects of environmental enrichment on psychostimulant intake.

- In the **seventh, and final, experiment**, we would like to test how environmental enrichment during development changes cocaine and methamphetamine self-administration in our [REDACTED] and [REDACTED] rats under both short and long access conditions. Combining the results of the final 2 experiments will reveal whether addicted individuals with a [REDACTED] or [REDACTED] may benefit only from pharmacological treatments (experiment 6), or also from potentially less invasive changes in the environment (experiment 7). The type of [REDACTED] animals to be used in the final experiment ([REDACTED]) depends on the results of experiment 4 ([REDACTED] 4, constitutive [REDACTED] rats are preferred).

References

- Ahmed SH, Koob GF (1998). Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point. *Science* **282**: 298-300.
- Enoch MA, Gorodetsky E, Hodgkinson C, Roy A, Goldman D (2011). Functional genetic variants that increase synaptic serotonin and 5-HT3 receptor sensitivity predict alcohol and drug dependence. *Mol Psychiatry* **16**: 1139-1146.
- Gerra G, Zaimovic A, Garofano L, Ciusa F, Moi G, Avanzini P *et al* (2007). Perceived parenting behavior in the childhood of cocaine users: relationship with genotype and personality traits. *Am J Med Genet* **144B**: 52-57.

[REDACTED]

- Kitamura O, Wee S, Specio SE, Koob GF, Pulvirenti L (2006). Escalation of methamphetamine self-administration in rats: a dose-effect function. *Psychopharmacology (Berl)* **186**: 48-53.

- Martin-Santos R, Torrens M, Poudevida S, Langohr K, Cuyas E, Pacifici R *et al* (2010). 5-HTTLPR polymorphism, mood disorders and MDMA use in a 3-year follow-up study. *Addict Biol* **15**: 15-22.

[REDACTED]

- Oakly AC, Brox BW, Schenk S, Ellenbroek BA (2014). A genetic deletion of the serotonin transporter greatly enhances the reinforcing properties of MDMA in rats. *Mol Psychiatry* **19**: 534-535.

[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?

The aim of the suggested experiments is to reveal how [REDACTED] contribute to the neurochemical and drug-taking effects of cocaine and methamphetamine. In addition, we would like to test the potential therapeutic effects of a number of treatments that are known to change the [REDACTED]. We seek permission to perform a series of 7 experiments. Based on our substantial experience with the suggested experiments (stereotactic surgery, microdialysis and [REDACTED] measurements: see a.o. [REDACTED] [REDACTED] IV surgery and short + long access self-administration: [REDACTED]; IV surgery, self-administration + serotonergic manipulations: see a.o. [REDACTED] ; Porsolt swim test + serotonergic manipulations: see a.o. H [REDACTED] [REDACTED] and optogenetics: see [REDACTED]) and the planning of these experiments, we believe it will take us 5 years to complete the whole study.

Note regarding feasibility: three additional project members have been added to assist during the experiments. These scientists will receive a thorough training by the responsible researcher. In addition, the research team can always rely on the knowledge and advice of various experts in the fields.

3.3 Relevance

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

Medical significance:

At this moment there is no FDA approved pharmacological treatment option for psychostimulant addiction. The aim of the proposed experiments is to study the cellular mechanisms underlying the rewarding and addictive effects of both cocaine and methamphetamine. Finding a novel working mechanism for the behavioral effects of these two psychostimulants and testing the putative therapeutic effects of a number of drugs that interfere with these mechanisms may in the future lead to the development of a highly desired pharmacological treatment for cocaine and methamphetamine dependence.

Scientific significance:

Our experiments will help to understand why human subjects marked [REDACTED] of extracellular serotonin as well as [REDACTED] in the psychostimulant-induced increase of the extracellular levels of this monoamine have an increased risk to become addicted. Finding an answer to this question is particularly relevant because at least 20% of the human population is marked by this serotonergic make-up of the brain. In addition, our experiments may reveal an important role for serotonin in the switch from moderate to compulsive psychostimulant intake.

Societal significance:

Drug dependence causes a large number of very unpleasant clinical symptoms (e.g. psychosis during the drug intake and anxiety and depression when the patient is in withdrawal). It may not only affect the patient's life, but also that of his/her family members and friends. In addition, drug addiction leads to high medical and economical expenses. In the US drug abuse accounts for more than \$500 billion per year associated to health care, productivity loss, crime, law enforcement and incarceration. Therefore, studying the working mechanisms of the behavioral effects of cocaine and methamphetamine and testing a number of novel treatment options for psychostimulant addiction may in the future have beneficial effects not only for addicted patients, but also for the other members of our society.

In summary, we believe that the medical, scientific and societal significance of our study outweighs the potential discomfort the animals may be exposed to.

3.4 Research Strategy

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

The project consists of the 7 experiments that are listed below.

We seek permission to perform our studies in [redacted] rats because [redacted]

Aims and details can be found in sections 3.1 (Background) and 3.4.2 (Research outline) respectively.

1a Microdialysis [redacted] [redacted] [redacted] rats

1b Microdialysis [redacted] [redacted] [redacted] rats

- Drugs and delivery: systemic injection of cocaine and methamphetamine.
- Readout parameter: extracellular serotonin levels in the central amygdala of rats [redacted] during both development and adulthood.
- We propose to perform microdialysis because it is a reliable, sensitive, and relatively easy technique to directly measure changes in the extracellular levels of serotonin in the brain. The advantage of the suggested technique above other techniques, like for instance immunohistochemistry, is that one doesn't need to sacrifice a large number of animals to measure the changes in serotonin over time. In addition, serotonin measurement can be performed in freely moving animals. Moreover, we have substantial experience with the suggested technique (e.g. [redacted])

2a [redacted] release [redacted] [redacted] rats

2b [redacted] release [redacted] [redacted] rats

- Drugs and delivery: systemic injection of cocaine and methamphetamine.

- Readout parameter: [redacted] in the central amygdala of rats that are lacking [redacted] or [redacted] during both development and adulthood.

- We propose to measure [redacted] according to our previously reported procedures ([redacted]). Compared to electronmicroscopy, our technique is faster, more sensitive, cheaper and most importantly more quantitative.

3a Self-administration [redacted] rats

3b Self-administration [redacted] rats

- Drugs and delivery: voluntary cocaine and methamphetamine self-administration under short and long access conditions.

- Readout parameter: number of active lever presses in rats that are lacking [redacted] or [redacted] during both development and adulthood.

- Self-administration is the most used technique to measure the intake of drugs of abuse in animals. It has high face validity to the human situation and is perfect to test the effects of anti-addiction treatments. Compared to systemic injections of drugs of abuse, in the self-administration procedures the intake of these drugs is voluntary and less stressful (no injections). The [redacted]

4a Self administration [redacted] rats

4b Self administration [redacted] rats

- Drugs and delivery: voluntary cocaine and methamphetamine self-administration under short and long access conditions.

- Readout parameter: number of active lever presses in rats that are lacking [redacted] or [redacted] during adulthood only.

- We propose to use [redacted] rats because in these animals, in contrast to [redacted] animals, we can decide ourselves when the gene of interest is turned on and when it is off.

5a Self-administration [redacted] rats with optogenetically [redacted] serotonin

5b Self-administration [redacted] rats with optogenetically [redacted] serotonin

- Drugs and delivery: voluntary cocaine and methamphetamine self-administration under short and long access conditions.

- Readout parameter: number of active lever presses under short and long access conditions in [redacted] or [redacted] rats of which the activity of the dorsal raphe nucleus neurons is manipulated.

- In contrast to [redacted] rats, in which the activity of the serotonergic neurons is changed throughout the brain, 'optogenetic rats' can be used to change the activity of the serotonergic neurons in one particular brain region only. Experiment 5 will be performed in collaboration with prof. dr. [redacted] who has extensive experience with the proposed technique.

6a Self-administration [redacted] rats with [redacted] at adulthood

6b Self-administration [redacted] rats with pharmacologically [redacted] serotonin at adulthood

6c Self-administration [redacted] rats with [redacted] during development

6d Self-administration [redacted] rats with pharmacologically [redacted] serotonin during development

- Drugs and delivery: voluntary cocaine and methamphetamine self-administration under short and long access conditions.

- Readout parameter: number of active lever presses under short and long access conditions in [redacted] or [redacted] rats that are treated with drugs known to [redacted]. [redacted] are proposed because they have already been found in other studies to change the brain levels of serotonin.

7a Self-administration [redacted] rats after environmental enrichment
7b Self-administration [redacted] rats after environmental enrichment

- Drugs and delivery: voluntary cocaine and methamphetamine self-administration under short and long access conditions.
- Readout parameter: number of active lever presses under short and long access conditions in [redacted] or [redacted] rats that are exposed to an enriched environment.
- Environmental changes have in other studies already proven to change the behavior of our [redacted] rats.

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.

Experiment 1a: Microdialysis in [redacted] rats / Experiment 1b: Microdialysis in constitutive [redacted] rats

Male rats will be implanted with a guide cannula in the brain under isoflurane anesthesia. After a recovery period of at least 7 days, a microdialysis probe is [redacted] into the guide cannula to measure the extracellular levels of serotonin using high-performance liquid chromatography equipment which is coupled to an electrochemical detector. 4 hours after probe [redacted] the rats receive a single injection of cocaine, methamphetamine or saline. Extracellular serotonin levels and behavior are recorded for 4 more hours. After this microdialysis experiment, the brains of the animals are collected using a guillotine.

Experiment 2a: [redacted] release in [redacted] rats / Experiment 2b: [redacted] release [redacted] rats

Male rats will receive a single injection of cocaine, methamphetamine or saline. After a period of 20 minutes, during which behavior is recorded, the brains of the animals are collected using a guillotine. The brain regions of interest are punched out and [redacted].

Experiment 3a: Self-administration [redacted] rats / Experiment 3b: Self-administration [redacted] rats

Male rats will be equipped with a catheter in the jugular vein under isoflurane anesthesia. The tip of the catheter is secured to a cannula that is fixed to the back of the animal. This cannula will be connected to a syringe, which delivers an intravenous injection of cocaine or methamphetamine every time the animal presses a lever. To model moderate psychostimulant intake, rats will be daily exposed to the self-administration chamber for 1 hour only (short access group). To study the compulsive intake of cocaine and methamphetamine, new rats will be exposed to the self-administration chambers for 6 hours per day (long access group).

Rats will be exposed to psychostimulant self-administration chambers for 28 days (10 days of 1-hour-lasting training sessions + 18 consecutive days of short and long access exposure to cocaine or methamphetamine), whereafter the animals are tested for 2 more days in the Porsolt swim test

(daily placement of the rat into a glass cylinder filled with water). After this behavioral test that measures the animal's emotional (i.e. depression-like) state, rats are placed again in the self-administration chambers while cocaine or methamphetamine is replaced by saline. The resulting extinction of psychostimulant seeking is measured for an additional period of 10 days. After this extinction period, the re-instatement of psychostimulant intake will be studied for a final period of 5 consecutive days. 24 Hours after the last re-instatement session, the brains of the animals are collected using a guillotine.

Experiment 4a: Self-administration [redacted] rats / Experiment 4b: Self-administration in [redacted] rats

Male rats of which [redacted] or [redacted] turned off only during development will be equipped with a catheter in the jugular vein according to the procedures described in experiment 3. After recovery, these rats will be trained for cocaine or methamphetamine self-administration for 10 days, whereafter the animals will be exposed to either short or long access sessions of psychostimulant intake for an additional period of 18 consecutive days. Similar to the previous experiments, the animals will also be tested for 2 days in the Porsolt swim test + 10 days of extinction and 5 consecutive days of re-instatement. 24 Hours after the last re-instatement session, the brains of the animals are collected using a guillotine.

Remark: The psychostimulant intake of these [redacted] rats will be compared to the psychostimulant intake observed [redacted] rats of experiment 3, in which [redacted] or [redacted] during both development and adulthood.

**Experiment 5a: Self-administration in [redacted] rats with optogenetically [redacted] serotonin
Experiment 5b: Self-administration in [redacted] rats with optogenetically [redacted] serotonin**

Male [redacted] or [redacted] rats will be equipped with a catheter in the jugular vein according to the procedures described in experiment 3. After 10 days of cocaine or methamphetamine self-administration training, these rats will be injected with viral vectors [redacted] under the influence of light (optogenetic [redacted] of dorsal raphe nucleus (DRN) neurons). These viral vectors will be locally applied using the surgery procedures similar to the procedures described in experiment 1. After 1 week of recovery + 2 more weeks of viral vector incubation, rats will be exposed to either short or long access psychostimulant self-administration for an additional period of 18 consecutive days. Similar to the previous experiments, the animals will also be tested for 2 days in the Porsolt swim test + 10 days of extinction and 5 consecutive days of re-instatement. 24 Hours after the last re-instatement session, the brains of the animals are collected using a guillotine.

Remark: the group of rats to be used [redacted] is depending on the results of experiments 3 and 4. Because [redacted], [redacted] rats are preferred above [redacted] rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self administration.

**Experiment 6a: Self-administration [redacted] rats with [redacted] at adulthood
Experiment 6b: Self-administration [redacted] rats with pharmacologically [redacted] serotonin at adulthood
Experiment 6c: Self-administration [redacted] rats with [redacted] during development
Experiment 6d: Self-administration [redacted] rats with pharmacologically [redacted] serotonin during development**

In experiments 6c and 6d, male rats that had access to respectively a [REDACTED] enriched diet after birth will be equipped with a catheter in the right jugular vein according to the procedures described in experiment 3. After recovery, these rats will be trained for cocaine or methamphetamine self-administration for 10 days, whereafter the animals will be exposed to either short or long access sessions of psychostimulant intake for an additional period of 18 consecutive days. Similar to the previous experiments, the animals will also be tested for 2 days in the Porsolt swim test + 10 days of extinction and 5 consecutive days of re-instatement. 24 Hours after the last re-instatement session, the brains of the animals are collected using a guillotine.

In experiments 6a and 6b, before the 5 final short or long access psychostimulant self-administration sessions, as well as before the second Porsolt swim tests and the final 2 re-instatement sessions, treatment-naïve male rats will be systemically treated with ([REDACTED] [REDACTED] of extracellular serotonin respectively. On the first treatment day, rats will receive the solvent of these drugs ([REDACTED]

Remark: the group of rats to be used to pharmacologically reduce extracellular serotonin is depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, constitutive [REDACTED] rats are preferred above conditional [REDACTED] rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self-administration.

Experiment 7a: Self-administration [REDACTED] [REDACTED] rats after environmental enrichment
Experiment 7b: Self-administration [REDACTED] [REDACTED] rats after environmental enrichment

Male rats that grew up in an enriched environment (including 'catheter-proof' climbing, chewing, shredding, pushing and/or foraging toys) will be equipped with a catheter in the jugular vein according to the procedures described in experiment 3. After recovery, these rats will be trained for cocaine or methamphetamine self-administration for 10 days, whereafter the animals will be exposed to either short or long access sessions of psychostimulant intake for an additional period of 18 consecutive days. Similar to the previous experiments, the animals will also be tested for 2 days in the Porsolt swim test + 10 days of extinction and 5 consecutive days of re-instatement. 24 Hours after the last re-instatement session, the brains of the animals are collected using a guillotine.

Remark: the group of rats to be used to [REDACTED] is depending on the results of experiments 3 and 4. [REDACTED] financial reasons, [REDACTED] rats are preferred above [REDACTED] rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self-administration.

Note: more details on the experimental procedures can be found in the 'animal procedure' tab, section A2.

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

Combining the results of the suggested experiments is expected to provide vital information with respect to the role of [REDACTED] [REDACTED] in both the neurochemical and drug-taking effects of cocaine and methamphetamine. The first 2 experiments are designed to analyze the cellular mechanisms underlying the acute psychostimulant-induced increase of extracellular serotonin. The results of experiments 1 and

2 (milestone 1) will be used to select the drug(s) of abuse (cocaine and/or methamphetamine) and the subjects (██████ and/or ██████ to be tested in the remaining experiments. This means that the more invasive and time consuming cocaine and methamphetamine self-administration experiments 3 and 4 will be performed only in case experiments 1 and/or 2 show that the genetic deletion of ██████ or ██████ affects the neurochemical effects of cocaine or methamphetamine. The results of self-administration experiments 3 and 4 (milestone 2) are, in turn, crucial to select the type of ██████ rats (██████████████████ to be used in experiments 5, 6 and 7 (milestone 3). This means that the final brain region specificity studies (experiment 5), the pharmacological manipulations (experiment 6) and the environmental enrichment experiments (experiment 7) will be performed only in case experiments 3 and/or 4 show ██████████ of ██████ or ██████ changes the number of levers presses to obtain cocaine or methamphetamine.

By using this from neuron to behavior 'go / no go' strategy, we are able to adjust the number of animals to be tested to an absolute minimum. Depending on the results, we will need to use between 288 (only experiments 1 and 2) and 2080 (all experiments) rats (see section for details). If all 7 experiments are successful, we will need 5 years to complete the suggested work.

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	Experiments 1-2: microdialysis + ██████ release
2	Experiments 3-7: self-administration



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Experiments 1-2: microdialysis + ██████ release</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	Experiments 1-2: microdialysis + ██████ release
Serial number	Type of animal procedure					
1	Experiments 1-2: microdialysis + ██████ release					

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.

Microdialysis in [REDACTED] (exp 1a) and [REDACTED] (exp 1b) rats

Using microdialysis, extracellular serotonin levels are measured after a single systemic dose of cocaine (presumably 15 mg/kg) or methamphetamine (presumably 1.5 mg/kg) in [REDACTED] and [REDACTED] (exp 1b) rats. [REDACTED] Combining the results of the suggested experiments we aim to answer the important question whether the two psychostimulants under investigation increase the synaptic levels of serotonin because of [REDACTED], [REDACTED]. Neurotransmitters are collected using a dialysis probe [REDACTED] into the brain region of interest and serotonin is separated from the remaining neurotransmitters using high performance liquid chromatography (HPLC), whereafter its concentration will be measured using electrochemical detection (ECD).

[REDACTED] release in [REDACTED] and [REDACTED] ([REDACTED] rats

An additional group of [REDACTED] rats as well as an extra group of [REDACTED] rats will also receive a single systemic injection of the two psychostimulants (presumable doses: see above), [REDACTED]

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

Stereotactic surgery (exp 1a/b):

- Male rats will be implanted with a guide cannula in the brain (surgery time: approximately 45-60 minutes). Stereotactic surgery will be performed under isoflurane anesthesia. Lidocaine spray will also be applied before the periosteum is removed. Between the different surgeries, tools will be sterilized using a heat sterilizer and the skin of the animal will be disinfected using iodine and alcohol pads. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused small breaks are taken after the surgery of every 2 rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. Immediately after surgery, rats will be injected with an analgesic drug (probably: Flunixin). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the at least 7-days-lasting recovery time, the condition of the animals will carefully be monitored (water consumption, weight, behavior, condition of the wound, condition of the fur) and rats will be treated once daily with an antibiotic drug (probably: Cefazolin).

Microdialysis (exp 1/b): start between 8 and 9 am

- After the recovery period, a microdialysis probe is inserted into the guide cannula to measure the extracellular levels of serotonin using high performance liquid chromatography (HPLC) equipment which is coupled to an electrochemical detector (ECD).

Psychostimulant-induced behavior (exp 1a/b, 2a/b): start between 12 and 13 pm

- Rats receive a single injection of cocaine (presumable dose: 15 mg/kg), methamphetamine (presumable dose: 1.5 mg/kg) or saline (presumable volume: 1 ml/kg) and behavior is recorded for an additional period of 4 hours (exp 1/b) or 20 mins (exp 2a/b).

day 0: Decapitation (exp 1a/b, 2a/b):

- When the behavioral recordings are done, the brains of the animals are collected using a guillotine. These brains are used to measure the local changes in [REDACTED] (exp 1a/b) or the [REDACTED] levels of serotonin in the brain regions of interest (exp 2a/b).

Total duration of the various experiments:

- exp 1a/b: 1 day of surgery/recovery + 6 more days of recovery + 1 day of microdialysis = 8 days
- exp 2a/2b: 1 day (20 mins).

Justification of approach:

- We propose to perform microdialysis because it is a reliable, sensitive, and relatively easy technique to directly measure changes in the extracellular levels of serotonin in the brain. The advantage of the suggested technique above other techniques, like for instance immunohistochemistry, is that one doesn't need to sacrifice a large number of animals to measure the changes in serotonin over time. In addition, serotonin measurement can be performed in freely moving animals. Compared to electronmicroscopy, our technique to measure the [REDACTED] is faster, more sensitive, cheaper and, most importantly, more quantitative. The suggested procedures are based on previous experience ([REDACTED]). If minor changes have to be made, this will first be discussed with the institutional Welfare Officer (IVD). If necessary, an amendment will be submitted to the Central Authority for Scientific Procedures on Animals (CCD).

Note 1: Only the animals of experiment 1 will undergo surgery

Note 2: To ensure that, at any given time, test and control rats are exposed to the same conditions, the animals of every single experiment will be equally distributed across test and control groups.

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

The minimum number of animals to be used in every single experiment is calculated using a power analysis (see section B1 for details). After reaching a milestone (see section 3.4.3: coherence), data will first be analyzed and follow-up studies will only be performed if the previous studies have revealed promising results. By using this 'go / no go' approach (see also section 3.4.3: coherence) we will significantly reduce the risk of performing animal studies that should not have been performed.

Data will be statistically analyzed using an ANOVA with the factors genotype, treatment and time (exp 1a and 1b) and genotype and treatment (exp 2a and 2b).

B. The animals

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

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 280. The animal origin is described in the Table.
Justification of the animals:

We seek permission to perform our studies in [redacted] rats because [redacted] are the main proteins regulating respectively the re-uptake and intra-[redacted] levels of serotonin. Only male rats will be used because fluctuations in the levels of stress hormones, associated with the menstrual cycle of female rats, may negatively affect the outcome of the suggested studies. The rats have to be adult to ensure that the volume of the central amygdala is maximal.

Treatment groups:

exp 1a: Microdialysis in [redacted] rats

[redacted] saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12
WT: saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12

exp 1b: Microdialysis in constitutive [redacted] rats

[redacted] saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12
WT: saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12

exp 2a: [redacted] release in [redacted] rats

[redacted] saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12
WT: saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12

exp 2b: [redacted] release in constitutive [redacted] rats

saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12
WT: saline n=12, cocaine n=12, methamphetamine n=12

Power analysis:

Previous studies using psychostimulant-treated knock-out animals have revealed a significant genotype effect when the effect-size is 50% (mean is 150% of mean WT). Using this effect size, together with the obtained standard deviation and an alpha-value of 0.05 and a power of 0.80 revealed a minimum number of 10 rats per treatment group. Per treatment group 2 rats have been added to compensate for the animals that have to be excluded from our study because of incorrect placement of the microdialysis probe (exp 1a/b) or because of incorrect punching of the amygdala (exp 2a/b). If the number of animals has to be adjusted due to unforeseen circumstances, this will first be discussed with the institutional Welfare Officer (IVD). If necessary, an amendment will be submitted to the Central Authority for Scientific Procedures on Animals (CCD).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
exp 1a: Wistar ████ ██ + ████ WT	Own breeding program	72	Adult
exp 1b: Wistar ████ ██ + ████ WT	Own breeding program	72	Adult
exp 2a: Wistar ████ ██ + ████ WT	Own breeding program	72	Adult
exp 2b: Wistar ████ ██ + ████ WT	Own breeding program	72	Adult

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:

To answer our research questions we need to study the neurochemical changes after cocaine or methamphetamine in the brains of animals with a reduced expression of either [REDACTED] or [REDACTED]. For this we use our unique [REDACTED] knock-out rats. Human subjects cannot be used because many people taking psychostimulants do also abuse other 'serotonin-changing' drugs like nicotine, alcohol and/or opiates. In addition, the amount of psychostimulant intake and the time between final drug use and the collection of brain tissue cannot be controlled in human subjects. Lower animals cannot be used because there is no microdialysis equipment available (invertebrates) or the surgery procedures are relatively complicated (mice) leading to an unacceptable high exclusion of animals (i.e. mice in which the position of the probe or punch was wrong). Cell-lines cannot be used because we need link neurochemical changes to changes in behavior. From our previous studies we know that in rats microdialysis is relatively easy to perform, resulting in reliable results.

Reduction:

We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatments. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power.

Refinement:

See section D2 below.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every two rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available.

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.

At least 2 weeks before surgery (exp 1a and 1b) or the behavioral measurements (exp 2a and 2b), rats will be housed in groups of 2 or 3, in an animal room with a reversed day/night cycle and shelters will be provided. The rats that have undergone surgery (exp 1a and 1b) will be singly housed. Cagemates are removed because they will damage the cannula. Given that a collision with the sharp edges of a shelter may result in the loss of the cannula, shelters are replaced by wooden blocks and nest material. Rats are housed under a reversed day/night cycle to make sure that they will show the largest possible repertoire of different behaviors when they are tested.

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?

Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. The animal's welfare may also be affected by the lack of a shelter or cagemates.

Explain why these effects may emerge.

Surgery, recovery from surgery, removal of shelters and cagemates.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every two rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimenter and the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available.

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.

If the animal loses its cannula or when the bodyweight after surgery stays below 85% of the pre-surgery weight for 3 consecutive days, animals will be euthanized using CO₂. In case of unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no water intake), or when the animal does not respond to a stimulus anymore, it will also be sacrificed using CO₂.

Indicate the likely incidence.

Previous studies have shown that less than 5% of the animals reach their humane endpoint.

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).

exp 1a/1b: moderate, exp 2a/2b: mild

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.

Rats will be sacrificed using a guillotine. Brains will be used to locate the microdialysis probe track (exp 1a/1b) and to measure ████████ levels of serotonin (exp 2/b) as well as gene expression levels (exp 1a/1b and 2a/2b).

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.
- 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 2	Type of animal procedure Experiments 3-7: self-administration

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.

Cocaine and methamphetamine self-administration (exp 3, 4, 5, 6 and 7) in ■■■■ (a) and ■■■■ (b) rats

Using the self-administration paradigm, the voluntary intake of cocaine (presumable dose: 0.5 mg/kg/infusion) or methamphetamine (presumable dose: 0.05 mg/kg/infusion) will be established in ■■■■ rats. ■■■■ rats lack plasmalemmal serotonin re-uptake transporters and ■■■■ rats lack an important enzyme to synthesize and store serotonin. Combining the results of the suggested experiments we aim to answer the important question whether serotonin re-uptake inhibition and/or the release of serotonin from presynaptic storage pools contribute to psychostimulant addiction. Rats will be exposed to either daily 1h sessions or 6h sessions of psychostimulant self-administration. The short access paradigm models limited drug intake, whereas the long access paradigm models drug dependence.

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

IV surgery (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- Male rats will be equipped with a catheter in the jugular vein under isoflurane anesthesia (surgery time: approximately 30-45 minutes). The tip of the catheter is secured to a cannula that is fixed to the back of the animal. In addition, lidocaine spray will be applied to the skin. Between the different surgeries, tools will be sterilized using a heat sterilizer and the skin of the animal will be disinfected using iodine and alcohol pads. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused small breaks are taken after the surgery of every 3 rats and no more than 12 rats will undergo surgery per day. Immediately after surgery, rats will be injected with an analgesic drug (probably: Flunixin). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the at least 7-days-lasting recovery time, the condition of the animals will carefully be monitored (water consumption, weight, behavior, condition of the wound, condition of the fur) and rats will be intravenously treated once daily with a mix of Heparin (anticoagulant) and an antibiotic drug (probably: Cevazolin).

Self-administration training (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- After the recovery period, the IV cannula will be connected to a syringe, which delivers an intravenous injection of cocaine (presumable dose: 0.5 mg/kg/infusion) or methamphetamine (presumable dose: 0.05 mg/kg/infusion) every time the animal presses a lever. Psychostimulant self-administration training (1 h daily session) takes 10 days. ■■■■

Stereotactic surgery (exp 5a/b):

- Rats will be implanted with a guide cannula in the dorsal raphe nucleus (surgery time: approximately 45-60 minutes). Stereotactic surgery will be performed under isoflurane anesthesia. Lidocaine spray will also be applied before the periosteum is removed. Between the different surgeries, tools will be sterilized using a heat sterilizer and the skin of the animal will be disinfected using iodine and alcohol pads. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused small breaks are taken after the surgery of every 2 rats and no more than 8 rats will undergo surgery per day. Immediately after surgery, rats will be injected with an analgesic drug (probably: Flunixin). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the at least 7-days-lasting recovery time, the condition of the animals will carefully be monitored (water consumption, weight, behavior, condition of the wound, condition of the fur) and rats will be treated once daily with an antibiotic drug: (probably: Cefazolin).

Normal and compulsive self-administration (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- 18 Consecutive days of short access (1h daily sessions) or long access (6 h daily sessions) to cocaine (presumable dose: 0.5 mg/kg/infusion) or methamphetamine (presumable dose: 0.05 mg/kg/infusion) self-administration.

2 Days of Porsolt swim test (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- Daily placement of the rat into a glass cylinder filled with water. We will score immobile behavior during the first and second exposure to the water (day 1: 15 min, day 2: 5 min) in order to verify whether the intake of cocaine or methamphetamine has resulted in a 'depression-like state'. Alternative approaches do not work in rats (e.g. the tail suspension test for mice), require additional surgery (e.g. intracranial self-administration), interfere with the same brain systems as cocaine and methamphetamine do (e.g. the sucrose preference test), or reflect more 'anxiety-like', instead of 'depression-like', behavior (e.g. elevated plus-maze).

Extinction (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- Rats are again placed in the self-administration chambers (4 h per day for 10 days) while cocaine or methamphetamine is replaced by saline. Extinction is necessary to measure the below-mentioned re-instatement of psychostimulant taking behavior.

Re-instatement (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- Re-exposure to cocaine or methamphetamine self-administration for 5 consecutive days. Re-instatement after extinction is the most commonly used procedure to measure 'relapse' to drug addiction. The re-instatement of drug abuse after abstinence is a landmark feature of drug dependence.

Decapitation (exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b):

- 24 Hours after the self-administration experiments are finished, the brains of the animals are collected using a guillotine. These brains are used to measure the local changes in gene expression.

Total duration of the various experiments:

- exp 3a/b, 4a/b, 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b: [REDACTED]

Justification of approach:

- Self-administration is the most used technique to measure the intake of drugs of abuse in animals. It has high face validity to the human situation and is perfect to test the effects of anti-addiction treatments. Compared to repeated systemic injections of drugs of abuse, in the self-administration procedures the intake of these drugs is voluntary and less stressful (no injections). [REDACTED]

[REDACTED] The suggested procedures are based on literature and previous experience ([REDACTED]). If minor changes have to be made, this will first be discussed with the institutional Welfare Officer (IVD). If necessary, an amendment will be submitted to the Central Authority for Scientific Procedures on Animals (CCD).

Note 1: Only the rats of experiment 5 are submitted to a double surgery procedure.

Note 2: The number of and time between the short or long access self-administration sessions as well as the order of the various tests are identical for all the animals ([REDACTED']). To ensure that, at any given time, test and control rats are exposed to the same conditions, the animals of every single experiment will be equally distributed across test and control groups.

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

The minimum number of animals to be used in every single experiment is calculated using a power analysis (see section B1 for details). After reaching a milestone (see section 3.4.3: coherence), data will first be analyzed and follow-up studies will only be performed if the previous studies have revealed promising results. By using this 'go / no go' approach (see also section 3.4.3: coherence) we will significantly reduce the risk of performing animal studies that should not have been performed.

Data will be statistically analyzed using a repeated ANOVA [REDACTED] and self-administration sessions (exp 3a/b, 4a/b) [REDACTED] treatment and self-administration sessions (exp 5a/b, 6a/b/c/d, 7a/b).

B. The animals

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

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 1792. The animal origin is described in the Table.

Justification of the animals:

We seek permission to perform our studies in [redacted] rats because [redacted] are the main proteins regulating respectively the re-uptake and intra-[redacted] levels of serotonin. Only male rats will be used because fluctuations in the levels of stress hormones, associated with the menstrual cycle of female rats, may negatively affect the outcome of the suggested studies. The rats have to be adult to ensure that the diameter of the jugular vein is maximal.

Treatment groups:

3a Self-administration in [redacted] rats:

[redacted] short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12
constitutive [redacted] WT: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

3b Self-administration in constitutive [redacted] rats:

constitutive [redacted] short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12
constitutive [redacted] WT: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

4a Self-administration in conditional [redacted] rats:

conditional [redacted] short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12
conditional [redacted] WT: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

4b Self-administration in conditional [redacted] rats:

conditional [redacted] short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12
conditional [redacted] WT: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

5a Self-administration in constitutive or conditional [redacted] rats with optogenetically reduced serotonin:

[redacted] control vector: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14
WT control vector: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14
[redacted] serotonin decreasing vector: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14
WT serotonin decreasing vector: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14

Remark: the group of rats to [redacted] is depending on the results of experiments 3 and 4. Because

of financial reasons, [redacted] rats are preferred above conditional [redacted] rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self-administration.

5b Self-administration in [redacted] rats with optogenetically enhanced [redacted] serotonin:

[redacted] + control vector: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14

WT + control vector: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14

[redacted] + serotonin [redacted]: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14

WT + serotonin [redacted]: short access: cocaine n=14, methamphetamine n=14; long access: cocaine n=14, methamphetamine n=14

Remark: the group of rats to be used to optogenetically enhance extracellular serotonin is depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, constitutive [redacted] rats are preferred above conditional [redacted] rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self-administration.

6a Self-administration in constitutive or conditional [redacted] rats with [redacted] at adulthood:

[redacted] + saline + pCPA (within rat design) short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + saline + pCPA (within rat design): short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

[redacted] is depending on the results of experiments 3 and 4. [redacted], unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self-administration.

6b Self-administration in constitutive or conditional [redacted] rats with [redacted] at adulthood

[redacted] + saline + FLUOX (within rat design): short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + saline + FLUOX (within rat design): short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

Remark: the group of rats to be used to [redacted] is depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, constitutive [redacted] rats are preferred above conditional [redacted] rats, unless the first group of rats does not display [redacted].

6c Self-administration in constitutive or conditional [redacted] rats with [redacted] during development

[redacted] + normal diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + normal diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

[redacted] + [redacted]: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + tryptophan-free diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

Remark: the group of rats to be used to pharmacologically reduce extracellular serotonin is depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, rats are preferred above conditional rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self administration.

6d Self-administration in constitutive or conditional rats with pharmacologically enhanced serotonin during development

+ normal diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + normal diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

+ 5-HTTP-enriched diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + 5-HTTP-enriched diet: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

is depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, rats, unless the first group of rats does not display a change in self administration.

7a Self-administration in rats after environmental enrichment:

+ normal cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + normal cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

+ enriched cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + enriched cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

Remark: the group of rats to be used to test the effects of is depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, rats are preferred above conditional rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self administration.

7b Self-administration in constitutive or conditional rats after environmental enrichment:

+ normal cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + normal cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

+ enriched cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

WT + enriched cage: short access: cocaine n=12, methamphetamine n=12; long access: cocaine n=12, methamphetamine n=12

Remark: the group of rats to be used to test the effects depending on the results of experiments 3 and 4. Because of financial reasons, rats are preferred above conditional rats, unless the first group of rats does not display a change in psychostimulant self administration.

Power analysis:

Previous studies using psychostimulant-treated knock-out animals have revealed a significant genotype effect when the effect-size is 50% (mean \square is 150% of mean WT). Using this effect size, together with the obtained standard deviation and an alpha-value of 0.05 and a power of 0.80 revealed a minimum number of 10 rats per treatment group. Per treatment group 2 rats have been added to compensate for the animals that have to be excluded from our study because of IV catheter obstruction (exp 3, 4, 6 and 7). In case IV surgery is combined with stereotactic surgery, an additional 2 animals have been added to compensate for incorrect placement of the guide cannula that is used to inject the viral vectors into the DRN (exp 5). If the number of animals has to be adjusted due to unforeseen circumstances, this will first be discussed with the institutional Welfare Officer (IVD). If necessary, an amendment will be submitted to the Central Authority for Scientific Procedures on Animals (CCD).

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
exp 3a: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	96	adult
exp 3b: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	96	adult
exp 4a: Wistar \square \square and \square WT	Generated by Sage labs	96	adult
exp 4b: Wistar \square \square and \square WT	Generated by Sage labs	96	adult
exp 5a: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	224	adult
exp 5b: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	224	adult
exp 6a: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	96	adult
exp 6b: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	96	adult
exp 6c: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	192	adult
exp 6d: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	192	adult
exp 7a: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	192	adult
exp 7b: Wistar \square \square and \square WT	Own breeding program	192	adult

C. Re-use

Will the animals be re-used?

C. Re-use

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:

To answer our research questions we need to study cocaine or methamphetamine self-administration in animals with a reduced expression of either [REDACTED] or [REDACTED]. For this we use our unique [REDACTED] knock-out rats. Human subjects cannot be used because many people taking psychostimulants do also abuse other 'serotonin-changing' drugs like nicotine, alcohol and/or opiates. In addition, the amount of psychostimulant intake and the time between final drug use and the collection of brain tissue cannot be controlled in human subjects. Lower animals cannot be used because there is no self-administration equipment available (invertebrates) or the surgery procedures are relatively complicated (mice) leading to an unacceptable high exclusion of animals (i.e. mice in which the catheter could not be placed in the jugular vein). Cell-lines cannot be used because we need to measure behavior. From our previous studies we know that in rats self-administration is relatively easy to perform, resulting in reliable results.

Reduction:

We are using the absolute minimum number of animals necessary to still be able to discover potentially statistical significant differences between the various genotypes and/or treatments. Using even less animals leads to an increase of the standard error of mean (sem), thereby reducing the statistical power.

Refinement:

See section D2 below.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every 3 rats and no more than 12 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug), Cefazolin (antibiotic drug) and Heparin (anticoagulant). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available.

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.

At least 2 weeks before IV surgery (exp 3, 4, 5, 6 and 7), rats will be housed in groups of 2 or 3, in an animal room with a reversed day/night cycle and shelters will be provided. After surgery, cagemates are removed because they will damage the cannula. Given that a collision with the sharp

edges of a shelter may result in the loss of the cannula, shelters are replaced by wooden blocks and nest material. Rats are housed under a reversed day/night cycle because the increased exploration during the testing period will significantly facilitate the self-administration training.

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?

Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. The animal's welfare may also be affected by the Porsolt swim test, withdrawal from drug (ab)use, and a lack of a shelter or cagemates.

Explain why these effects may emerge.

Surgery, recovery from surgery, Porsolt swim test and the (temporary) removal of cocaine, methamphetamine, shelters and cagemates.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions (please note that drug withdrawal is necessary to test the re-instatement of drug taking behavior and removal of shelters and cagemates will significantly reduce the number of animals that have otherwise to be excluded from our study). Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the skin. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. In order to stay focused, small breaks are taken after the surgery of every 3 rats and no more than 12 rats will undergo surgery per day. After surgery, rats will be treated with Flunixin (analgesic drug), Cefazolin (antibiotic drug) and Heparin (anticoagulant). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. All animals will be handled to familiarize them to the experimenter and the experimental procedures and cage enrichment, in the form of a small wooden block and nest material, will also be available.

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.

If the animal loses its cannula or when the bodyweight after surgery stays below 85% of the pre-surgery weight for 3 consecutive days, animals will be euthanized using CO₂. In case of unexpected changes in the animal's behavior (e.g. no self-grooming or no water intake), or when the animal does not respond to a stimulus anymore, it will also be sacrificed using CO₂.

Indicate the likely incidence.

Previous studies have shown that less than 5% of the animals reach their humane endpoint.

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).

exp 3a/b, 4a/b, 6c/6d and 7a/b: moderate (one surgery + withdrawal from drug (ab)use), exp 5a/b and 6a/b: severe (two surgeries or one surgery + systemic injections + withdrawal from drug (ab)use).

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.

Rats will be sacrificed using a guillotine. Brains will be used to measure gene expression levels and, in case of experiment 5, to verify the location of viral vector injection.

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

Radboud 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
AVD103002015228
Bijlagen
2

Datum 28-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015228. 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. 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: Radboud Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
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: ██████████
Functie: Postdoc
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker in opleiding
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

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: 25 september 2015
Geplande einddatum: 25 september 2020
Titel project: [REDACTED]
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe inzichten in en behandeling van cocaïne en methamfetamine verslaving
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
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: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
p/a Miriam [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
AVD103002015228
Bijlagen
2

Datum 28-08-2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 28 augustus 2015
Vervaldatum: 27 september 2015
Factuurnummer: 201570228

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015228	€ 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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101
6525EZ Nijmegen


Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015228

Bijlagen
1

Datum 21 september 2015
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte mevrouw [REDACTED],

Op 27 augustus 2015 hebben wij uw aanvraagformulier voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Psychostimulants: uptake or synthesis?' met aanvraagnummer AVD103002015228. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De onderzoeker zal zowel de go/no-go momenten als de criteria om een optionele behandeling uit te voeren met de IvD afstemmen. U kunt met uw project [REDACTED] starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 september 2015 tot en met 25 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 24 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. 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.

Datum
21 september 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015228

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. 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: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Geert Groteplein-Noord 9
Postcode en woonplaats: 6525EZ Nijmegen
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 25 september 2015 tot en met 25 september 2020, voor het project [REDACTED] met aanvraagnummer AVD103002015228, volgens advies van Dierexperimentencommissie RUDEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Postdoc.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen per post op 27 augustus 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c. Advies van dierexperimentencommissie RUDEC d.d. 24 augustus 2015 en ontvangen op 25 augustus 2015.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren voor het vergunde tijdvak	Ernst
Experiments 1-2: microdialysis + [REDACTED] release	Ratten; Wistar; [REDACTED] en [REDACTED] en WT; volwassen	280	Licht en matig
Experiments 3-7: self-administration	Ratten; Wistar; [REDACTED] en [REDACTED] en WT; volwassen	1792	Licht, matig en ernstig

Beoordeling achteraf

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk 25 september 2021 plaatsvinden.

Voorwaarde:

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

De onderzoeker zal zowel de go/no-go momenten als de criteria om een optionele behandeling uit te voeren met de IvD afstemmen.

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

Datum
21 september 2015

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015228

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 die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk 25 september 2021 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.

27 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 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? <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 10300 <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>Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> </tr> </table>	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									
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. <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>Geert Groteplein 10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td>9101</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td>NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td>UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein 10	Postbus	9101	Postcode en plaats	6500HB Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983	Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud					
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.	<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>PhD student</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	PhD student		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD student																
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 [redacted] Dhr. Mw.
- Functie Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling [redacted]
- Telefoonnummer [redacted]
- E-mailadres instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 2 4 . 0 9 . 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 . 1 1 . 2 0 1 7
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Imaging in hard tissue eneneering
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Beeldvorming in harde tissue engineering
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [redacted]
- E-mailadres [redacted]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 468,00 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, factuurinformatie

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED] Instantie voor dierenwelzijn

Plaats [REDACTED] Nijmegen

Datum [REDACTED] 25 - 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).
- 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. | Imaging in hard tissue engineering |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|---|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" 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.

Despite its static aspect, bone is a highly dynamic tissue that undergoes continuous remodeling through osteoclast-mediated erosion activity, versus osteoblast-mediated deposition of new bone. This same process is the reason behind the high regenerative capacity of bone in the healing pathway after a bone fracture. Nevertheless in case of critical size defects, for instance after a tumor resection, bone regeneration is not adequate to achieve complete recovery. In such cases usually a surgical intervention with placement of a graft material is needed. One common treatment for such cases is obtaining autograft bone from an easily accessible site in the body (often from the iliac crest) and the subsequent transplantation of such autologous bone into the defect region. However, the low supply of transplantable bone, the necessity of additional surgery, and the high morbidity at the donor site, incited the scientific community to look for valid alternatives to the bone autograft. Specifically, the development of biocompatible and biodegradable bone substitutes, have opened new frontiers in what nowadays is known as *hard tissue engineering* (hTE) [1].

Among all the commercially available bone substitutes, calcium phosphate cement (CPC) is widely used because of its optimal biological properties. The material resembles natural bone and as such has excellent biocompatibility, and guides new bone formation (osteoconductivity). Furthermore, the injectability of CPC makes this biomaterial useful especially for minimally invasive surgical operations. In that way the material can be injected into places without large surgical intervention, can be applied in locations which are difficult to reach, and after hardening will fit optimally into the defect area [2].

CPC materials are considered as a valid alternative to bone autograft and have found several clinical applications as bone substitute, especially in craniofacial applications, as a bonefiller in osteonecrotic lesions, and as reinforcement for cancellous osteoporotic bone around orthopaedic implants [3,4,5]. Additionally CPCs are widely used as fillers in several dental applications, to accelerate healing process and or provide augmentation around dental implants, and in periodontal pockets [6].

Once implanted in the body, the biomaterial needs to be identified and visualized in order to evaluate the outcome of the surgical procedure. Furthermore the material needs to be followed over the time in order to confirm integration and degradation ratio, and consequently to evaluate the new bone formation, which will end up with a complete bone recovery. Nowadays an increasing number of technologies are used in order to diagnose bone fractures, infections and cancers, such as X-ray, Computer Tomography (CT) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) [7]. Moreover, new imaging technologies (e.g. Ultrasound (US), Positron Emission Tomography (PET), Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT), Optical Imaging (OI), Photoacoustic Imaging (PI), which so far were mainly used for soft tissues, are finding application also in hard tissues. Also the

combination of these techniques has been investigated in order to obtain more comprehensive and robust information than any single imaging approach. The most commonly used multimodality technologies are, for instance, MRI/CT, PET/CT, MRI/US, SPECT/CT and PET/OI [8]. However, few studies have been performed in order to evaluate the applicability of imaging modalities in hTE, where a potential implanted material needs to be followed longitudinally. Specifically, when CPC is chosen as a bone substitute, several issues can be found because of the high similarity with the natural osseous phase. For instance, due to the high content of calcium salts, CPC has similar radiopacity to bone in conventional X-ray techniques, which means that CPCs are naturally not, or at least not clearly visible on radiographs [7].

With this project we want to investigate the possibility to use innovative contrast agents into CPC material, in order to develop an advanced biodegradable material for hard tissue applications (e.g. in bone or teeth), that can be either clearly visualized once implanted in the body and followed over the time. A multimodal imaging approach will be pursued in order to get high sensitivity and high spatial resolution images of the implanted material. It is intended to image the implanted material over the entire time of the (osteoclast mediated) material degradation, and the subsequent (osteoblast mediated) new bone formation. To study whether the imaging indeed is congruent with these phases, we intend to experiment by adding specific growth factors (e.g. RANKL and BMP-2) aimed to modulate the processes of degradation and bone formation.

Therefore we expect that the development of this new biomaterial together with a multimodal imaging approach can allow a better understanding of the material integration and degradation *in vivo*. This does not only enhance the applicability of the current CPC material but will also be facilitating future biomaterial development for hard tissue engineering applications.

This project is part of a broader Marie Curie fellowship called iTERM (imaging in Tissue Engineering and Regenerative Medicine) and funded by the European Commission.

References

1. Stevens M.M., Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*. 2008 May; 11(5):18-25.
2. Low K.L., Tan S.H., Zein S.H., Roether J.A., Mouriño V., Boccaccini A.R., Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010 Jul; 94(1):273-86.
3. Sariibrahimoglu, K., et al., Injectable biphasic calcium phosphate cements as a potential bone substitute. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2014. 102(3): p. 415-22.
4. Ambard, A.J. and L. Mueninghoff, Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties. *J Prosthodont*, 2006. 15(5): p. 321-8.
5. Larsson, S., et al., Injectable calcium phosphate cement for augmentation around cancellous bone screws. *In vivo biomechanical studies*. *J Biomech*, 2012. 45(7): p. 1156-60.
6. Xie, C., et al., The use of calcium phosphate-based biomaterials in implant dentistry. *J Mater Sci Mater Med*, 2012. 23(3): p. 853-62.
7. Griffith, J.F. and H.K. Genant, New imaging modalities in bone. *Curr Rheumatol Rep*, 2011. 13(3): p. 241-50.

9.

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 aim of this project is to develop a biodegradable material for hard tissue engineering (e.g. bone and teeth) which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.

During the last years, in our [redacted] ials, we achieved ample expertise in the field of bone substitutes, especially about calcium phosphate-based materials. Several CPC compositions have already been developed in [redacted], and the most successful composition has currently been submitted for CE approval. With the advent of new tissue engineering technologies we enlarged our knowledge in the field of the imaging of bone and bone substitutes. This was possible also thanks to the advanced imaging technologies specifically available at the [redacted] facility of the RadboudUMC, Nijmegen. Moreover, we already investigated and pursued the possibility to use contrast agents in order to enhance the contrast between the CPC composition and the natural bone phase [1,2]. For such reasons, we believe that we have all the necessary expertise and facilities to successful achieve the main goal of our project.

References

3.3 Relevance

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

Biocompatible and biodegradable biomaterials are necessary as a scaffold for cellular ingrowth, to enhance new tissue regeneration. An ideal combination between non-invasive imaging modality and biomaterial is a prerequisite in hard tissue engineering, especially when multiple scans are needed which can expose the body to high doses of contrast agents or radiation. Multimodal imaging modalities are becoming an useful strategy in order to obtain more detailed functional and anatomical information for a more specific patient diagnosis.

In this context, the development of an innovative biodegradable bone substitute, which can be detected clearly through radiation free technologies (e.g. MRI), would perfectly fit for any hard tissue application. The use of that material can facilitate a better understanding of the implant integration

in the body which eventually can be useful not only for the improvement in material development, but also for a deeper understanding of the pathway behind the processes of material degradation and the new bone formation. All such information can be used in hTE in order to develop materials that can enhance natural bone regeneration and can lead to a faster healing process after a surgical procedure. Furthermore a material that is longitudinally detectable will be an optimal tool for surgeons and dentists who want to evaluate the outcomes of an implant procedure and follow the healing process of the patient over time. This can bring several advantages in term of patient monitoring and health care service, for example the possibility to rapidly identify abnormalities, infections and micro-cracks in the implant material.

3.4 Research Strategy

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

Magnetic resonance will be used as primary imaging technique because it is a radiation free methodology. In combination with MRI other imaging modalities, such as μ CT, US, PET, SPECT, OI and PI will be chosen in accordance with a specific contrast agent. In order to reach the goals of this project our first step (*in vitro* and *ex vivo* experiments) are already completed. A defined CPC composition, already known for its mechanical, degradable and biological properties, was combined with specific biocompatible contrast agents without altering the initial CPC mechanical and biological features. The mechanical and biological properties were checked and validated by *in vitro* experiments (material characterization, mechanical testing, degradation test, cell culture). Once the material was obtained and validated *in vitro*, also *ex vivo* studies were recently performed. Animal bones and teeth were collected from cadavers of animals already used in other experiments (re-use). Through these tests we could optimize the visibility properties of the material required for an optimal imaging in the actual tissue (e.g. determine the right amount and achieve equal distribution of contrast agent). Furthermore this new developed composition was verified to exhibit better imaging properties when compared to the previously developed composition (██████████) and does not show any drawbacks, such as the aforementioned blooming effect. The shape of the implanted material can be easily recognized which is an huge improvement compared with the previous composition where the implant could only be localized.

Now that *in vitro* and *ex vivo* studies are performed, animal experiments are requested in order to evaluate the material integration and degradation over the time. For the *in vivo* tests, only the composition is chosen which gave the best performance in terms of mechanical and biological properties and the best outcomes in terms of detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Through the *in vivo* study the visibility of the material will be assessed over a specific time that concurs with the material degradation and the consequent new bone formation, which are processes that can not be studied outside of the living organism. This is justified by the fact that the complexity of the pathway behind the material degradation and the new bone formation is not reproducible in an *in vitro* system.

After the implantation *in vivo* (in a surgically created condyle defect) the animals will be scanned at only two specific time points (i.e. according to ██████████ these time points will be 4 weeks and 8 weeks; s██████████ and the detectability of the implant will be evaluated.

Finally, at the end of the experimental time, the animal will be sacrificed and the femora will be processed for histology in order to evaluate new bone formation.

Once the material is successfully tested *in vivo*, in a new experiment the material with contrast agent will be associated to a specific slow release carrier for growth factors (██████████). It is already known that these factors will result in a modulation of the bone healing process.

██████████ In this way, we will be able to prove that our imaging results are indeed longitudinally detectable and quantification of the signal can be directly correlated to the degradation of the material and subsequent ingrowth of bone.

Considering that a) the duration of each experiment will be approximately 8 months (including material preparation, in vivo experiment, data collection and analysis), b) in the unlucky case of inconveniences we can have some delay, and c) the machines at the PRIME facility are used also by several others operators and therefore they are frequently engaged, we estimate that the project will have to be performed in a step wise manner over a total period of approximately 25 months (i.e. November 2017).

References

[Redacted] Dual contrast
[Redacted]
[Redacted]

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

We will test the new compositions in a small animal model (i.e. Wistar rats), as are most commonly used for bone implants [1, 2, 3, 4]. Bone remodeling will be evaluated by means of the material implantation in the condyle. For this purpose, a cylindrical defect of 3mm in depth and 3 mm in diameter will be surgically created. After implantation the material, degradation will be checked at time points of 4 and 8 weeks, which is based on [Redacted] Two or more different imaging modalities will be used to detect the material according to the specific contrast agent used (i.e. MRI, CT, US, PI, SPECT, PET and OI).References

1. Muschler G.F., Raut V.P., Patterson T.E., Wenke J.C., Hollinger J.O., *The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine*. Tissue Eng Part B Rev. 2010 Feb;16(1):123-45.
2. American Society for testing and Materials, www.astm.org
3. International organization for Standardization, www.iso.org
4. European Commission, <http://ec.europa.eu>
5. [Redacted]

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points

In this project an innovative material composition will be investigated. The material consists of a bone substitute component (always CPC) combined with a specifically designed contrast agent ([Redacted]). The experimental groups will consist of CPC with and without contrast agent. The differences in visualization capacity between the treated (CPC with contrast agent) and control (CPC without contrast agent) groups will be qualitatively and quantitatively evaluated.

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	rat condyle defeact



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>rat condyle defeact</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	rat condyle defeact
Serial number	Type of animal procedure					
1	rat condyle defeact					

[REDACTED]

After these different compositions will be tested *in vivo*, [REDACTED] that will give the best performance in terms of detectability, quality of the images, intensity of the signal, resolution and amount of information achievable about degradation of the material and the new bone formation, will be chosen for further *in vivo* investigation: The CPC/contrast agent will be augmented with a slow release carrier for specific factors [REDACTED]. These factors have a very different effect ([REDACTED]) but taken together in this context (i.e. hard Tissue Engineering) they can induce a faster bone healing.

The experimental procedure consists in different steps:

- Administration of a complete regimen of analgesics and antibiotics.
- Anesthetization of the animals.
- Exposure of the knee joint after a longitudinal parapatellar incision.
- Preparation of a small cylindrical defect in the condyle (3 x 3 mm).
- Injection of the material and closure by suturing.
- Careful monitoring of uneventful wound healing
- Follow-up of the material: at two time points (e.g. 4 and 8 weeks) the defect will be imaged by two/three different imaging modalities under general anesthesia.
- At the end the animal will be euthanized and the femura will be harvested for further histological investigation.

Defect in rat condyle is a well know procedure which is often used to test the biocompatibility of several implantable biomaterials (e.g. metal, ceramics, cements). The femora are easily accessible bone , and only the defect in condyle allows for an enough amount of material to be injected, which can be compared at same time with both cortical and trabecular bone phases. Furthermore this procedure was usually used in previous studies performed in our laboratory. Using the same model we can acquire all the needed expertise to perform this procedure reducing the risk of animal loss or implant failure.

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

The samples size determination for the *in vivo* rat study is calculated in line with the requirements of the CDL animal facility of Radboudumc, Nijmegen, and based on the existing literature and the experience of our research group.

In order to define the sample size a power calculation will be performed and the animals will randomly assigned to each group using a computerized random generator (www.random.org).

In order to reduce the number of animals, extensive *in vitro* studies have already been accomplished and used to choose the material which give the best performance in terms of detectability, quality of the image, signal intensity and resolution. We also increased the number of implant per animal as much as possible (i.e. using both legs).

B. The animals

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

Healthy adult male Wistar rats (about 6 weeks old) are chosen as animal model to study our bone substitutes. Based on our previous studies we estimate to use 12 animals for group which means that we need a total of 120 animals for this project. Animals will be purchased from a registered Dutch breeding company.

The rat femur is an easily accessible place and the bone is big enough in order to perform cylindrical defects (3x3 mm) which can be injected with a sufficient amount of material. Bilateral defect will be made, however, it is not possible to create the same defect size in other bones (such as the tibia).

Wistar rats are chosen as animal model because they are largely used especially to evaluate the performance of bone substitutes materials and because they can give ideal results in terms of reliability, reproducibility and accuracy. Rats are considered an optimal model especially for primary screenings *in vivo*. Furthermore rats are more ethically accepted compared with other animal models (e.g. dog, sheep and goat).

Considering that, *a.* we will use both femora for each rat, *b.* we will have different experimental groups (see the list below), *c.* based on our previous studies *d.* there are two timepoints and *e.* we do not foresee loss of animal exceeding one group size ; we foresee , the maximal number of rats needed is 120.

List of the experimental groups:

References

6. American Society for testing and Materials, www.astm.org
 7. International organization for Standardization, www.iso.org
 8. European Commission, <http://ec.europa.eu>

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Wistar rat	registered breeder	120	20 weeks maximum

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. Degradation of-, and new bone formation around a material, can only take place in an animal model in which the material can be

implanted. The determining factors such as a normal circulatory system, movement, wound healing, growth of the bone cells, etc, are such complex processes that they cannot be completely and reliably be reproduced outside of the body system.

MRI scanners that exist for preclinical imaging research can only be used for the mouse or rat. However, the mouse is too small to be able to make a critical (i.e. not spontaneously healing) bone defect. Therefore the animal model selected for the experiments is rat. Rats are the most commonly used animal model in which the materials can be studied, with a high degree of reliability and reproducibility. Rats are considered an optimal model for primary screening *in vivo*. Furthermore rats are more ethically accepted compared with other animal models (i.e. dog, sheep and goats).

REDUCTION. In order to reduce the number of animals a significant effort has been put in testing the new materials in tissues *ex vivo*, in pieces of cadaver bone obtained from dead animals. After the pre-screening tests only the compositions that gave the best performance in terms of detectability, quality of the image, signal intensity and resolution were chosen for the *in vivo* studies. In this way the number of materials to be used *in vivo* is reduced as much as we could.

For all samples size calculation, a power analysis was performed in order to provide the required number of animals to be used.

Additionally we chose to increase the number of implants for each animal as much as we could (i.e. using both legs of the rat) according with the common standard for experimental animal model procedures.

REFINEMENT. The surgical procedure will be performed by expert operators under general anesthesia and antibiotic regimen in order to reduce the pain and other adverse symptoms like infections.

Anesthesia and analgesia protocols are followed as specified in the guidelines of the CDL of the RadboudUMC Nijmegen. If necessary the experiments will be supplemented in accordance with advice from veterinarians, animal welfare officers, and biotechnicians. The animals will be housed under standard conditions in groups. Animals will be weighed and monitored regularly to avoid unexpected symptoms that can result in animal loss, or alterations of the outcomes.

According with our experience no further discomfort for the animals are expected with exception of the anesthesia and analgesia.

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

In order to reduce the stress during the experimental time the animals will be housed in group.

Animals will be observed daily and weighted every week. In the unlucky case of occurrence of unexpected clinical events, that can cause distress or that are difficult to treat, the animals will be euthanized according to the standard procedure (humane endpoint) used for each animal species by the CDL of the RadboudUMC of Nijmegen.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

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.

In order to reduce the pain in the animals painkiller will be used according with the expertise of the veterinarians and the biotechnicians of the CDL of the RadboudUMC, Nijmegen.

Thanks to our expertise and previous studies in this field we already defined an optimized protocol for the implant of materials in condyle defect in rat animal models. Following that protocol the the pain in the animals is reduced as much as we could.

Furthermore the surgical procedure will be performed only by expert operators.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

According to ours previous *in vivo* studies no others adverse effects on the animal welfare are expected. Historically all our animals did non show any problems related to limping, restriction in movement or wound opening. All the animals recover after few hours postsurgery.

The only adverse effects expected are related to the use of anesthesia and analgesia (e.g. suffocation, cessation breathing, hypotermia, tachycardia, arrhythmias, moderate hypotension).

Explain why these effects may emerge.

Cause of adverse effects are related to the use of anesthesia and analgesia (e.g. suffocation, cessation breathing, hypotermia, tachycardia, arrhythmias, moderate hypotension).

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

After the surgical procedure the animals are constantly monitored until they are conscious again and show stable vital signs.

Later on the animals will be observed daily for any signs of surgical complications (i.e. infection, wound opening) and weighted every week.

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.

Prolonged weekly loss of weight (more than 15-20%), wound infection or opening, prolonged diarrhea (>3 days) and general humane endpoints (e.g. severe bleeding, laboured breathing, etc).

Indicate the likely incidence.

The incidence of humane endpoint is very low (< 5%).
Historically we have not had animal loss or unexpected complications.

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 only discomfort forecasted is related to the anesthesia and to the euthanasia injections.
Both surgical procedures can cause a low blood pressure and decrease in respiratory function. The probability for these discomforts is around 100%, therefore we estimate a MODERATE degree of discomfort within the first day after surgery.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

L. Method of killing

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

The animals will be sacrificed at the end of the experimental time. This is necessary in order to harvest the tissues that are needed for histological analysis.

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 2015-0035
2. Titel van het project: Imaging in hard tissue engineering.
3. Titel van de NTS: Beeldvorming in harde tissue engineering.
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: 22-05-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-06-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 25-06-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 25-06-2015
 - advies aan CCD: 24-08-2015
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: 08-06-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Er staan nog veel taalfouten in deze aanvraag. Wij adviseren u de tekst van deze projectaanvraag nogmaals goed na te kijken met meer aandacht voor het verbeteren van formuleringen (o.a. enkel- of meervoudsvormen, tegenwoordige of verleden tijd), grammatica en spelfouten, en hierbij het vier-ogen-principe toe te passen.
 - **Niet-technische samenvatting:**
 - De woordkeus in onderdeel 3.1 is nog onvoldoende afgestemd op de doelgroep. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.
 - **Project Proposal:**
 - De titel bevat een spelfout.

-3.1. Uit de gegeven achtergrond wordt onvoldoende duidelijk wel kennishiaat de onderzoekers willen vullen met de resultaten van dit onderzoek. Zij schrijven dat er op dit vlak al veelbelovende resultaten zijn (gepubliceerd) maar dat 'Some issues remain unsolved'. Omdat zij niet toelichten welke issues dat zijn blijft de rationale voor het project onduidelijk. Het blijft eveneens onduidelijk waarom zij twee materialen willen ontwikkelen, en waarom zij een experiment met groeifactoren willen doen. De onderzoekers worden verzocht dit te verduidelijken.

-3.4.1.

*De onderzoekers doen er verstandig aan in dit deel van het project aandacht te besteden aan de planning van het onderzoek. Waarom wordt voorzien dat het project tot 1-11-2017 duurt?

*Het gebruik van groeifactoren is nog niet opgenomen in de strategie-beschrijving van het project.

*De verantwoording voor het aantal in vivo te testen materialen en voor de keuze van deze materialen is nog onvoldoende. De onderzoekers worden verzocht dit beter toe te lichten.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. De onderbouwing voor het aantal tijdstippen en de keuze voor deze tijdstippen ontbreekt. De onderzoekers worden verzocht dit toe te voegen.

- A, tweede vraag. De genoemde groeifactoren hebben een zeer verschillende uitwerking. De onderzoekers worden verzocht een keuze te maken en deze te onderbouwen.

-B. Het experimentele design is nog onduidelijk. De onderzoekers worden verzocht te verduidelijken of zij botdefecten in zowel de femora als de tibia maken, en deze keuze te onderbouwen. Bij het aanbrengen van 4 botdefecten kunnen alle condities in één dier onderzocht worden, waardoor de spreiding afneemt en er minder dieren nodig zijn. De onderzoekers worden verzocht de experimentele groepen duidelijker te omschrijven en aan te geven welke combinaties van materialen zij in elke groep willen testen. Ook worden zij verzocht toe te lichten waarom zij in het groeifactor experiment ook de condities 'geen defect' en 'empty defect' opnieuw willen testen. Indien deze controle condities noodzakelijk zijn worden de onderzoekers verzocht het design van het experiment zodanig aan te passen dat de controle condities van de experimenten met en zonder groeifactoren gedeeld kunnen worden.

-K. De omschrijving van de duur van het ongerief als gevolg van de anesthesie en de operatie is niet juist. De onderzoekers worden verzocht dit opnieuw te formuleren.

- Datum antwoord: 25-06-2015

- Strekking van de antwoorden:

- **Niet-technische samenvatting:**

Answer: Zoals voorgesteld is de text aangepast , en sluit deze nu hopelijk wel aan bij de doelgroep.

- **Project Proposal:**

- Answer: The titel is corrected

- -3.1.

Answer: We have added a clear explanation about two main issues that we want to solve in multi modal imaging , which are the blooming effect caused by SPIO particles in MRI; and the short lifetime of gold particles in CT analyses. We agree with reviewer that the initially

mentioned two materials were unclear. Actually we aim to develop only one final material even though in the project this will be tested two different contrast agent compositions. This is now clarified throughout. A coherent explanation about the use of growth factors is included as well.

-3.4.1.

*Answer: we estimated that the total time needed for this project is 25 months ; since there is limited capacity on the PRIME equipment the experiment will likely be executed in smaller runs. With preparation, imaging, and then (histological) processing approximately 7-8 months per step are envisioned hence the end date was set November 2017.

*Answer: changed as suggested; explanation about growthfactors is added in this section.

*Answer: Also see above, there is only one material which will be supplemented with different contrast agents. The number of compositions to be tested is based on the already completed *in vitro* studies on detectability, quality of the image, intensity of the signal and resolution. Explanation has been added to the text.

- **Description of Animal Procedures:**

-A, eerste vraag. Answer: the choice of the time points (i.e. 4 and 8 weeks) comes from literature and from our previous studies. The researcher provided some references for this information in the 'Project Proposal' in the section 3.4.1.

-A, tweede vraag. Answer: We want to validate whether our imaging signal is in agreement with the actual degradation of CaP material (by osteoclasts) and formation of bone (by osteoblasts). Therefore we want to use both growth factors because RANKL can induce an osteoclast proliferation that can lead to a faster material degradation, while, from the other side, BMP-2 can induce endogenous bone formation.

-B. Answer: The rat tibia is too small for the proposed cylindrical defect. It does not allow the injection of enough material. The researcher provided a table with the list of the experimental group foreseen and agrees with the reviewer about the fact that the control groups (such as non defect and empty defect) do not need to be repeated when the growth factors will be tested.

-K. Answer: reformulated as requested

- De vragen hebben geleid tot aanpassingen in het projectvoorstel en de beschrijving van de dierproeven.

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 'to develop a biodegradable material for hard tissue engineering which can be longitudinally imaged with high spatial resolution using different multimodal imaging approaches.' Calcium fosfaat cement (CPC) wordt veel gebruikt als botvervangend materiaal in de kliniek bij onder meer craniofaciale chirurgie, en orthopaedische en kaakimplantaten. CPC heeft zeer goede biologische eigenschappen, maar is op scans vrijwel niet te onderscheiden van autoloog bot. De onderzoekers willen contrastmateriaal toevoegen aan CPC, waardoor het te zien zal zijn op scans waarbij geen radioactieve straling wordt gebruikt. Het genezingsproces is daardoor beter te volgen op een voor de patiënt minder belastende manier. Tevens wordt door dit onderzoek het effect van toevoeging van groeifactoren aan CPC op de afbraak van dit synthetische materiaal en de vorming van nieuw bot bij ratten duidelijk. Op termijn kunnen de resultaten van dit onderzoek bijdragen aan betere monitoring van patiënten, bijvoorbeeld doordat abnormaliteiten, infecties en haarscheurtjes in of rond een aangebracht implantaat beter zijn te onderkennen. Het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal vertegenwoordigt in de ogen van de DEC een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak zijn verantwoord en kunnen, binnen de gevraagde termijn, leiden tot beantwoording van de gestelde vragen en daarmee tot het behalen van de doelstelling. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven en beschikt over alle benodigde voorzieningen. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de zichtbaarheid op scans van de onderzochte materialen, en over het effect van het toevoegen van groeifactoren aan deze materialen op de vervanging van het synthetische materiaal door nieuw bot bij ratten.
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. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het aanbrengen en opvullen van een aantal botdefecten, en de pijn en hinder tijdens de genezing hiervan. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde botoperaties en scans onder anesthesie in als matig. Het cumulatief ongerief voor de dieren is derhalve juist ingeschat in de aanvraag, te weten matig voor alle dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De onderdelen van het project die in vitro en ex vivo met behulp van slachtmateriaal uitgevoerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor de resterende onderzoeksvragen is het onderzoek in de beschreven diermodellen noodzakelijk. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Er worden twee botdefecten per proefdier aangebracht om het aantal benodigde dieren zo laag mogelijk te houden. De resultaten uit het eerste deel worden gebruikt om het meest veelbelovende materiaal uitgebreider te testen in aanwezigheid van groeifactoren. Het

maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van het project. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de statistische onderbouwing van het aantal benodigde dieren. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 120 ratten.

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. Bij de opzet wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door toepassing van goede pijnbestrijding en anesthesie. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. 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 worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven met betrekking tot de vraag welk contrastmateriaal dat wordt toegevoegd aan CPC leidt tot de beste beelden bij niet-radioactieve imaging, en met betrekking tot de vraag of het effect van toevoeging van groeifactoren meetbaar is. Het is aannemelijk dat dit onderzoek kan bijdragen aan het ontwikkelen van een synthetisch botvervangend materiaal dat beter zichtbaar is op scans. Het belang van het beschikbaar komen van een dergelijk materiaal acht de DEC substantieel, omdat eventuele complicaties bij bijvoorbeeld implantaten beter en sneller zijn vast te stellen met minder belasting van de patiënt.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt worden matig ongerief zullen ondervinden als gevolg van het aanbrengen en opvullen van botdefecten en de scans. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

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

Radboud Universiteit Nijmegen

██████████

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

AVD103002015229

Bijlagen

2

Datum 28-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015229. 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. 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 plaatsvervangende 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 [REDACTED]

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: 24 september 2015
Geplande einddatum: 1 november 2017
Titel project: Imaging in hard tissue engineering
Titel niet-technische samenvatting: Beeldvorming in harde tissue engineering
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
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: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 25 augustus 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

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
AVD103002015229

Bijlagen

2

Datum 28-08-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 28 augustus 2015

Vervaldatum: 27 september 2015

Factuurnummer: 201570229

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015229	€ 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]@radboudumc.nl
Verzonden: dinsdag 8 september 2015 12:36
Aan: info@zbo-ccd.nl; [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: RE: Vragen AVD103002015229
Categorieën: [Redacted]

Geachte leden CCD,

Hierbij onze antwoorden tav uw mail dd 4 sept jl.

1) Er zijn drie redenen om mannelijke ratten te gebruiken. Ten eerste, is het bekend dat mannen een betrouwbaardere opzet vormen omdat de botheling niet beïnvloed wordt door hormonale schommelingen. Ten tweede zijn in vrijwel alle eerdere literatuur referenties waarin dit model gebruikt wordt, ook mannelijke dieren gebruikt. Voor de vergelijkbaarheid met de wetenschappelijke literatuur is dus ook het gebruik van mannelijke dieren gewenst. Tenslotte, is er nog een praktische reden; nl. de grootte van de femorale condyl is verschillend tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Het is alleen in mannelijke dieren goed mogelijk om het voorgestelde botdefect te prepareren [Ref. Tissue Eng Part C Methods. 2014 Jun;20(6):493-505].

2) Verzoek om het aantal dan aan te passen naar 108

3) Leges zijn verstuurd, met factuurnummer 201570229 op 2 sept jl.

Vr Groet namens de aanvragers,
[Redacted]

Kind regards,

[Redacted]

Radboud universitair medisch centrum
Dentistry, Biomaterials

[Redacted]

All my publications: [Redacted]

Present: Monday / Tuesday / Thursday / Friday

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: vrijdag 4 september 2015 16:26
Aan: [Redacted]
CC: Postbus instantie voor dierenwelzijn
Onderwerp: Vragen AVD103002015229

[Redacted]
Op 25 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229. Er zijn nog enkele zaken onduidelijk.

U geeft aan mannelijke ratten te willen gebruiken. Is het mogelijk ook vrouwelijke dieren te gebruiken, of kunt u aangeven waarom dat niet mogelijk is?

In uw Beschrijving Dierproeven beschrijft u dat er 12 ratten per groep worden gebruikt. U komt dan op 120 ratten in totaal. Er wordt een lijst van 9 experimentele groepen gegeven:



9 x 12 = 108. Hoe komt u aan 120 ratten?

Leges

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

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via e-mail. Om uw aanvraag in de volgende vergadering te kunnen bespreken, vraag ik u om uiterlijk **15 september 2015** te reageren.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

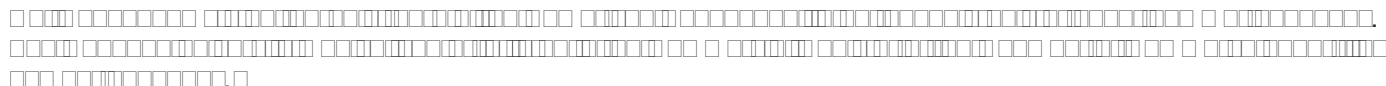
Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres info@zbo-ccd.nl. Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Met vriendelijke groeten,
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)
E: info@zbo-ccd.nl



Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op


<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

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: Radboud Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 september 2015 tot en met 1 november 2017, voor het project "Imaging in hard tissue engineering" met aanvraagnummer AVD103002015229, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 augustus 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 augustus 2015, ontvangen op 25 augustus 2015.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 september 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
rat condyle defeact	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / adult male Wistar (about 6 weeks old)	108	Matig / moderate	

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.