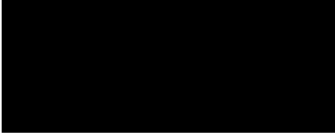




Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

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


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

Onze referentie W16-09S

Uw referentie
ccd-2015321, ccd-2015322,
ccd-2015326, ccd-2015327,
ccd-2015328, ccd-2015340

Briefkenmerk CCD-2016-293

Datum **06 DEC 2017**
Betreft Wob-besluit W16-09S

Geachte mevrouw 

In uw brieven van 5 april 2016 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) om informatie verzocht met betrekking tot de volgende projectvergunningen:

- 2015321 Het ontwikkelen van nieuwe therapieën/behandelmethode(n) om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen;
- 2015322 Nieuwe behandelmethode(n) voor schadelijke afweerreacties;
- 2015326 Bepalen van de kwaliteit van eiwitbronnen voor humane voeding;
- 2015327 Onderzoek naar de hersenkenmerken die beschermen tegen post-traumatische stressstoornis;
- 2015328 Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RVS vaccin;
- 2015340 Onderzoek aan griepvirusevolutie ter ondersteuning van interventie.

De ontvangst van uw verzoek op 5 april 2016 is bij brief van 26 april 2016 (per e-mail verzonden) aan u bevestigd.

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

Voor de afbakening van een bestuurlijke aangelegenheid kan worden gekeken naar onder andere de reikwijdte van een toepasselijk algemeen verbindend

voorschrift, de vergelijkbaarheid van het handelen van de normadressant en de normsteller, de kring van belanghebbenden of het van toepassing zijnde tijdvak.

Aangezien uw brieven (mails) telkens betrekking hebben op documenten die de betrokken vergunninghouders en DEC's op basis van hetzelfde algemeen verbind voorschrift hebben verstrekt, zijn wij, gelet op de jurisprudentie hierover, van mening dat uw brieven zien op één bestuurlijke aangelegenheid. Om die reden zijn de verzoeken om informatie samengevoegd. Hierbij kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de Raad van State van 24 augustus 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:2312) en de hiervoor reeds genoemde uitspraak van de Raad van State van 28 mei 2014.

Opschorting en verdaging

Met de brief van 26 april 2016 – op 26 april 2016 per mail aan u verzonden – is u kenbaar gemaakt dat de beslistermijn met vier weken is verdaagd. Daarnaast is bij brief van 23 mei 2016 – op 23 mei 2016 per mail aan u verzonden – aangegeven dat de beslistermijn met vier weken is opgeschort, vanwege het vragen van zienswijzen aan derde belanghebbenden. Een aantal betrokken derde belanghebbenden heeft verzocht om uitstel voor het indienen van een zienswijze. Een van die betrokken derde belanghebbenden heeft verzocht om uitstel tot 8 juli 2016. De CCD heeft hiermee ingestemd en middels de brief van 27 juni 2016 bent u op de hoogte gesteld van de nadere opschorting. Hierdoor is de uiterste beslistermijn verschoven naar 5 augustus 2016.

Ingebrekestelling

Op 18 augustus 2016 ontvingen wij uw ingebrekestelling. Uit artikel 4:17 lid 3 van de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) volgt dat wij u twee weken na de genoemde datum een dwangsom zijn verschuldigd, wanneer nog geen besluit is genomen (te weten vanaf 2 september 2016). Onder 'dwangsombesluit' wordt de hoogte van de dwangsom berekend.

Wettelijk kader

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

Inventarisatie documenten

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

Zienswijzen

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



Besluit

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

Reeds openbare documenten

Van iedere verleende vergunning wordt een niet-technische samenvatting (hierna: NTS) op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar. Per projectvergunning staat in de inventarislijst aangegeven welk document de NTS betreft. Ook de data van vergaderingen van de CCD – welke in het 'Advies CCD' worden genoemd – zijn reeds openbaar middels de verslagen van de vergaderingen van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD, via (onder andere) de zoekterm 'verslag'. De Wob is niet van toepassing op informatie die reeds openbaar is, waardoor uw verzoek voor wat betreft bovengenoemde informatie niet onder de reikwijdte van de Wob valt.

Overwegingen

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

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

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

Door enkele derde belanghebbenden is aangegeven dat de niet-technische samenvatting (NTS) volstaat voor wat betreft de openbaarmaking van de bij de vergunningen behorende documenten. Een van de derde belanghebbenden verwijst in dit kader naar artikel 43 van de Wet op de Dierproeven (hierna: Wod), maar hier wordt waarschijnlijk artikel 43 van de Europese Richtlijn 2010/63/EU (hierna: de richtlijn) bedoeld, over de niet-technische samenvatting van een project.

De richtlijn schrijft voor welke gegevens de NTS bevat en welke niet (artikel 43 eerste lid). Deze bepaling is vrijwel letterlijk geïmplementeerd in de Wod (artikel 10a vijfde lid), het Dierproevenbesluit (artikel 3) en de Dierproevenregeling (artikel 4). Er zijn geen aanwijzingen dat Nederlandse wet- en regelgeving op dit onderdeel ruimer is dan de richtlijn voorschrijft.

Met de publicatie van de NTS is niet beoogd tevens te voorzien in een bijzondere openbaarmakingsregeling. Daarnaast volgt uit de parlementaire geschiedenis van de Wob¹ dat de Wob geen bijzondere openbaarmakingsregeling is. Dit is bevestigd in de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (kenmerk 15/6463). De Wob is daarmee volledig van toepassing op de behandeling van het voorliggende Wob-verzoek. De CCD heeft naar aanleiding van het bovenstaande in haar vergadering van 15 juli 2016 besloten dat de Wob (volledig) van toepassing is en niet verder gaat dan de richtlijn.

Aanvullend merkt de CCD op dat met het verstrekken van de NTS niet volledig wordt tegemoetgekomen aan het Wob-verzoek. Uit het Wob-verzoek volgt dat wordt gevraagd om aanvragen van projectvergunningen met alle correspondentie hierover. Gelet op artikel 3 lid 5 van de Wob dient de CCD de informatie uit de genoemde dossiers openbaar te maken, tenzij daarvan op grond van de artikel 10 en 11 van de Wob opgenomen weigeringsgronden of beperkingen kan worden afgezien. Ingevolge artikel 7 lid 2 van de Wob kan het verstrekken van de verlangde informatie in een andere dan door de verzoeker gewenste vorm (bijvoorbeeld in de vorm van een samenvatting) slechts in het tweede lid omschreven situatie aanvaardbaar zijn. Niet is komen vast te staan dat er sprake is van een dergelijke situatie. Met het enkel verstrekken van de NTS wordt derhalve niet volledig aan het Wob-verzoek tegemoet gekomen.

Bedrijfs- en fabricagegegevens

Artikel 10 lid 1 aanhef en onder c van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

Inzichtelijk dient te zijn dat de in de stukken neergelegde informatie, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd zijn aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Het betreffende artikel dient naar zijn aard restrictief te worden uitgelegd. De ingediende zienswijzen van derde belanghebbenden spelen een belangrijke rol in de afweging van de betrokken belangen van de verzoeker van de documenten versus derde belanghebbenden.

Het slechts verwijzen naar het gegeven dat de informatie vertrouwelijk aan de overheid zou zijn verstrekt of dat sprake is van het in gevaar komen van de concurrentiepositie is onvoldoende voor een beroep op voornoemde weigeringsgrond. Dat openbaarmaking van de krachtens deze weigeringsgrond geweigerde informatie een inkijk zou geven in de bedrijfsvoering van het bedrijf is onvoldoende voor het oordeel dat het om vertrouwelijke bedrijfs- en fabricagegegevens gaat. Voor het bovenstaande wordt verwezen naar de

¹ Tweede Kamer vergaderjaar 2013-2014, 33 692, 24, blz. 4, 13 en 20, Eerste Kamer vergaderjaar 2013-2014, 33 692, D, blz. 8

Tweede Kamer vergaderjaar 2012-2013, 33 692, nr. 3, blz. 12, 14 en 17, Tweede Kamer vergaderjaar 1986-1987, 19859, nr. 2, blz. 19 en 23



uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: Raad van State) van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976) en de uitspraken van 20 november 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:2004) en 17 juli 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:288).

De vergunninghouder bij vergunning 2015328 heeft middels een zienswijze en per document aangegeven dat het projectvoorstel, de bijlage beschrijving dierproeven en het DEC-advies bedrijfs- en fabricagegegevens bevatten die vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld. Uit artikel 43 van de richtlijn volgt dat geen informatie openbaar mag worden waarmee eigendomsrechten worden geschonden, vertrouwelijke informatie wordt prijsgegeven en/of die de anonimiteit van de gebruiker of natuurlijke persoon in het gedrang brengt.

Zoals hiervoor reeds aangegeven, volgt uit de parlementaire geschiedenis van de Wob dat de Wob geen bijzondere openbaarmakingsregeling is. Dit is bevestigd in de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463). De bescherming van de hiervoor genoemde gegevens is in de Wob geregeld, middels de in artikel 10 en 11 van de Wob opgenomen weigeringsgronden.

Voorts stelt de vergunninghouder zich primair op het standpunt dat het projectvoorstel, de bijlage beschrijving dierproeven en het DEC-advies zodanig zijn doorvlochten van bedrijfs- en fabricagegegevens dan wel gegevens die onevenredig nadeel kunnen opleveren, dat deze documenten in beginsel in het geheel niet mogen worden geopenbaard. Subsidiar heeft de vergunninghouder aangegeven dat deze documenten specifieke informatie over het te ontwikkelen product een beschrijving van het nieuwe product en de toegevoegde waarde daarvan bevatten. Dit is informatie die inzicht geeft in de wijze waarop het nieuwe product wordt ontwikkeld. De verwijzingen naar door de vergunninghouder ingeschakelde derden geven inzicht in de strategie van de vergunninghouder om bepaalde onderdelen van onderzoeken uit te besteden. Deze strategie wordt door concurrenten niet gebruikt, maar wanneer zij inzicht krijgen in deze strategie, kunnen zij hun bedrijfsvoering hierop aanpassen, wat onevenredig voordeel voor de concurrentie oplevert.

Enkele definities, de inrichting van de dierproef, de wijze van vaccineren, de omvang van de groepen dieren en de criteria voor humane eindpunten zijn voor de vergunninghouder unieke gegevens en geven weer op welke wijze de vergunninghouder haar onderzoek/bedrijfsproces heeft ingericht en zijn om die reden volgens de vergunninghouder te kwalificeren als bedrijfs- en fabricagegegevens.

Blijkens de uitspraak van de Raad van State van 13 juli 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:1952) dienen belanghebbenden aannemelijk te maken op welke wijze openbaarmaking van de informatie inzicht verschaft in de bedrijfsvoering en op welke wijze concurrenten hiermee voordeel kunnen behalen.

De CCD acht het niet aannemelijk dat alle gegevens in de documenten projectvoorstel, bijlage beschrijving dierproeven en DEC-advies bedrijfs- en fabricagegegevens zijn, dan wel gegevens zijn die onevenredig benadelend werken. De CCD acht het voorts wél aannemelijk dat deze documenten bedrijfs- en fabricagegegevens bevatten. De vergunninghouder heeft volgens de CCD

voldoende inzichtelijk gemaakt dat bepaalde passages specifieke informatie over het te ontwikkelen product en de beschrijving van het nieuwe product bevatten.

In de documenten welke bij de zienswijzen zijn verstrekt, is naar het oordeel van de CCD concreet en nauwkeurig aangegeven welke informatie op basis van voornoemde weigeringsgrond geweigerd dient te worden. Gebleken is dat onder andere enkele definities, de wijze van vaccineren en de omvang van de groepen kenmerkend zijn voor het door de betreffende vergunninghouder te verrichten onderzoek en de manier waarop het onderzoek/bedrijfsproces is ingericht. Naast dat deze gegevens kenmerkend zijn, blijkt hieruit ook uit welke cruciale stappen het onderzoek bestaat en hoe de vergunninghouder tot de keuze van die stappen is gekomen. Bovendien geeft het inzicht in de afwegingen van de vergunninghouder op belangrijke beslispunten. Om die redenen wordt de betreffende informatie niet geopenbaard.

Het bijbehorende DEC-advies bevat een onderdeel, waarbij een aantal specifieke vragen wordt gesteld over definities, de wijze van vaccineren en de inrichting van de dierproef. Conform hetgeen hiervoor is aangegeven, wordt deze informatie ook in dit document niet geopenbaard.

Verwijzingen naar door de vergunninghouder ingeschakelde derden zullen niet worden geopenbaard, omdat is aangegeven dat bepaalde onderdelen van het onderzoek worden uitbesteed aan derden en dit inzicht verschaft in de gebruikte strategie. Bovendien geeft dit inzicht in de kring van afnemers dan wel leveranciers van de vergunninghouder, nu is gebleken dat bepaalde onderdelen van het onderzoek door anderen worden uitgevoerd. Derhalve staat artikel 10 lid 1 aanhef en onder c van de Wob in de weg aan openbaarmaking. Hiervoor kan verwezen worden naar de uitspraak van de Raad van State van 30 november 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3165).

Aangaande vergunning 2015340 heeft de vergunninghouder aangegeven dat wetenschappelijk onderzoek kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten en concreet toepasbare vindingen. Dergelijke informatie is te beschouwen als bedrijfsinformatie en dient vertrouwelijk te blijven totdat het komt tot wetenschappelijke publicatie of octrooiering. De naam van de DEC dient geanonimiseerd te worden, omdat deze informeert over een toeleverancier van de vergunninghouder. Namen, contactgegevens, data en jaartallen dienen volgens de vergunninghouder eveneens geanonimiseerd te worden, omdat dit bedrijfsinformatie betreft.

De algemene en niet nader onderbouwde stelling dat wetenschappelijk onderzoek kan leiden tot nieuwe wetenschappelijke inzichten en concreet toepasbare bevindingen is een te abstracte omschrijving, waarbij niet specifiek is aangegeven dat sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Voorts is niet inzichtelijk gemaakt hoe namen, contactgegevens, data en jaartallen kunnen worden beschouwd als bedrijfs- of fabricagegegevens. Het slechts noemen zegt niets over de mate van (bedrijfs)gevoeligheid en de gevolgen van openbaarmaking. Verwezen wordt naar de uitspraak van de Raad van State van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976). Ten aanzien van deelnemernummers of de naam dan wel aanduiding van een organisatorische werkeenheid van vergunninghouders heeft de rechtbank Gelderland in de uitspraak van 12 juni 2014



(ECLI:NL:RBGEL:2014:3654) aangegeven dat dit niet valt aan de merken als bedrijfs- of fabricagegegevens.

De bij bovenstaande vergunning behorende DEC heeft middels een zienswijze aangegeven dat de (interne) nummers van de projecten verwijzen naar c.q. herleidbaar zijn tot individuele instellingen of bedrijven en daarmee vertrouwelijke bedrijfsinformatie zijn voor zowel de DEC als de betrokken vergunninghouder. De naam van de DEC betreft een bedrijfsgegeven en kan later – in combinatie – worden gekoppeld aan een groter aantal projecten en daarmee gedetailleerd inzicht geven in de bedrijfsvoering.

De context dan wel bijzonderheden van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de vergunninghouder of adviserende DEC kunnen reden zijn voor het weigeren van hun bedrijfsnamen (verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016, AWB 15/6463). De context van de documenten geeft naar het oordeel van de CCD aanleiding voor het weigeren van de naam van de betreffende vergunninghouder en DEC. Onder het kopje 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling' zal hierop nader worden ingegaan.

Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

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

Alle vergunninghouders en DEC's doen een beroep op bescherming van de persoonlijke levenssfeer met het oog op weigering van persoonsnamen en gegevens die direct herleidbaar zijn naar personen. Het betreft (in ieder geval) persoonsnamen, directe telefoonnummers, directe e-mailadressen, handtekeningen, eventuele afkortingen van namen en specifieke functies die (onder andere) staan vermeld in de aanvraagformulieren, verzonden en ontvangen brieven, verzonden en ontvangen e-mails, vergunningen en beschikkingen.

De CCD is van oordeel dat het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer – waarmee deze gegevens worden beschermd – zwaarder dient te wegen dan het belang van openbaarheid van deze gegevens. Daarbij is van belang dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens deze gegevens voor eenieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. Dit is benadelend voor de betrokken personen. Zij kunnen hierdoor namelijk worden benaderd door eenieder die het niet eens is met hun werkzaamheden. De CCD zal de namen van personen en alle daar direct of indirect naar herleidbare gegevens blijven weigeren.

In de memorie van toelichting bij de Wod (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012-2013, 33 692, nr. 3) wordt benadrukt dat ook tot personen herleidbare gegevens onder de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kunnen vallen. Daarbij is in de memorie van toelichting aangehaald dat: "*het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer moet zwaar wegen.*" Betrokkenen moeten vrijelijk en anoniem hun werk kunnen doen. Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een

maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme. In het recente verleden zijn daar veel voorbeelden van geweest. Derde belanghebbenden hebben aangegeven dat medewerkers bij de uitgang van de instelling zijn opgewacht door dierenrechtenactivisten en aldaar bedreigend en intimideren zijn benaderd. Uit vaste rechtspraak volgt dat dierenrechtenactivisme ook bij de Wob een terugkerend onderwerp is.

Binnen de context van de opgevraagde documenten bestaat de vrees voor gevaar voor de persoonlijke levenssfeer en dat derde belanghebbenden als gevolg van openbaarmaking overmatig en mogelijk ook gewelddadig worden benaderd door dierenrechtenactivisten. De incidenten die zich in het verleden hebben voorgedaan, bevestigen dat een kleine groep mensen een reëel risico kan vormen en dat de vrees voor acties van dierenrechtenactivisten gerechtvaardigd is. Verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Midden-Nederland van 8 augustus 2016, zaaknummers UTR 15/3008 en UTR 15/3727. Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt uit de zeer recente uitspraken van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498).

De Raad van State stelt in deze laatste uitspraken dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder moet wegen dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

De CCD is van oordeel dat bij de afweging tot het wel of niet openbaar maken van bedrijfsgegevens een geheel andere is dan het weigeren van persoonsgegevens. Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van bedrijfsnamen van vergunninghouders versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel andere aard en kent ook een ander gewicht. De hierboven genoemde overwegingen geven op zijn minst aanleiding een zwaarder gewicht toe te kennen aan de belangen van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

De CCD heeft de zienswijzen van derde belanghebbenden betrokken in haar conclusie en is – zoals hiervoor is toegelicht – van oordeel dat de bescherming van de persoonlijke levenssfeer zwaarder weegt dan het belang van openbaarmaking.

Meerdere vergunninghouders en DEC's hebben aangegeven dat de dreiging van dierenrechtenactivisten nog altijd actueel is. De vergunninghouder bij vergunning 2015326 heeft aangegeven dat medewerkers van de instelling bij de uitgang van de instelling zijn opgewacht door dierenrechtenactivisten en aldaar bedreigend en



intimideren zijn benaderd. De vergunninghouder bij vergunning 2015328 heeft aangegeven dat bij een proefdierdeskundige van een instelling zuur door de brievenbus naar binnen is gegooid en het huis is beklad. Voorts geeft de vergunninghouder aan dat twee medewerkers van verschillende instellingen thuis ernstig zijn bedreigd en dat van in ieder geval één van hen het huis is vernield. Zoals hiervoor reeds aangegeven, is de CCD van oordeel dat personen die zijn betrokken bij dierproeven tegen voornoemde activiteiten beschermd dienen te blijven. Derhalve weegt het belang van bescherming van de persoonlijke levenssfeer zwaarder dan het belang van openbaarmaking.

In aanvulling hierop wordt het volgende opgemerkt. De vergunninghouder en DEC bij vergunning 2015321 hebben aangegeven dat ook handtekeningen en briefkenmerken, waarin de afkortingen van namen zijn opgenomen geweigerd dienen te worden, omdat deze gegevens direct herleidbaar zijn tot personen. Handtekeningen zullen niet worden geopenbaard, vanwege de kans op fraude. Onder het kopje 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling' zal hier nader op worden ingegaan. Afkortingen van namen zijn direct herleidbaar tot persoonsnamen en worden derhalve op grond van het bovenstaande geweigerd.

Proefdier- dan wel sublocaties die direct tot personen herleidbaar zijn en niet al eerder, bijvoorbeeld middels publicatie op een website, zijn geopenbaard, worden middels dit besluit niet geopenbaard. Hierbij kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463).

Voor wat betreft de specifieke dierproeflocaties kan tevens aangesloten worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) en de memorie van toelichting bij de Wod (*Kamerstukken II 2012/13, 33 692, nr. 3, p.14*). Uit de uitspraak volgt dat namen en (adres)gegevens van organisatorische werkeenheden waar onderzoek wordt verricht, op grond van artikel 10 lid 2 aanhef en onder e van de Wob niet hoeven te worden geopenbaard. Bovendien blijkt uit de memorie van toelichting: *dat door openbaarmaking van bepaalde gegevens die niet direct de persoonlijke levenssfeer raken, uiteindelijk toch achterhaald kan worden welke personen betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven. Hierbij kan worden gedacht aan openbaarmaking van een locatie waar dierproeven worden verricht.*

Uit de uitspraak van de Raad van State van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:CA2883) volgt voorts dat ambtenaren met een publieke functie en in de openbaarheid treden en ambtenaren die besluiten krachtens mandaat hebben ondertekend in beginsel moeten aanvaarden dat hun namen met de ondertekening van de besluiten naar buiten komen (zie tevens de uitspraak van de Raad van State van 6 augustus 2014, ECLI:NL:RVS:3002).

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

Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling

Conform artikel 10 lid 2 aanhef en onder g van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij

de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen dan wel van derden.

Herleidbaarheid

Integrale openbaarmaking van de door u opgevraagde gegevens leidt in bepaalde gevallen tot onevenredige benadeling van de organisaties en de medewerkers waarop de gegevens betrekking hebben. In de bijgevoegde inventarislijsten is per document aangegeven welke documenten informatie bevatten die rechtstreeks of op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken personen. Het is niet uitgesloten dat openbaarmaking van deze gegevens vanuit dierenrechtenactivisten buitensporige reacties kan opleveren jegens deze personen.

Naar aanleiding van hetgeen onder het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer' is aangegeven en vanwege hieronder te noemen redenen zullen de navolgende gegevens – waarmee deze organisaties of personen geïdentificeerd kunnen worden – uit de documenten worden verwijderd:

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

Voor wat betreft vergunning 2015322 hebben de vergunninghouder en DEC aangegeven dat een aantal literatuurverwijzingen geanonimiseerd dient te worden, omdat de verwijzingen direct leiden tot de betrokken onderzoekers en dat openbaarmaking hiervan onevenredig benadelend is voor de betrokken onderzoekers. De CCD acht (directe) herleidbaarheid naar betrokken personen om voornoemde redenen niet wenselijk en zal derhalve literatuurverwijzingen naar betrokkenen niet openbaren. Dit geldt tevens voor verwijzingen in de tekst naar eerder (nog niet gepubliceerd) eigen onderzoek, waarbij geen referenties zijn gebruikt, maar bijvoorbeeld de woorden "we have shown". Daarnaast wordt een specifieke term, die herhaaldelijk terugkomt in de documenten, geweigerd, omdat deze term kenmerkend is voor deze onderzoeksgroep en derhalve direct herleidbaar is.

Met betrekking tot vergunning 2015326 hebben de vergunninghouder en de DEC aangegeven dat verwijzingen naar onderzoeksgroepen en onderzoekers van de eigen instelling geweigerd dienen te worden. Dit geldt tevens voor locaties waar de onderzoeken plaatsvinden. Voorts dienen ook bepaalde termen en zinsdelen die met deze termen samenhangen te worden geweigerd, omdat deze kenmerkend zijn voor de betrokken onderzoeksgroep. Er is sprake van een exclusief onderzoek dat direct leidt tot de betrokken onderzoekers. De



onderzoeksgroep is van geringe omvang en eenvoudig via zoekmachines op internet te vinden.

Zoals hiervoor reeds aangegeven, acht de CCD (directe) herleidbaarheid naar betrokken personen en locaties waar dierproeven worden uitgevoerd niet wenselijk en derhalve zullen verwijzingen naar de eigen onderzoekers, onderzoeksgroepen en specifieke locaties worden geweigerd. Ditzelfde geldt voor enkele termen en zinsdelen die met deze termen samenhangen. Voor wat betreft dit laatste wordt tevens verwezen naar het onderdeel 'concurrentiegevoelige informatie'.

Aangaande vergunning 2015327 heeft de vergunninghouder aangegeven dat bepaalde tekstdelen niet geopenbaard mogen worden, vanwege de directe herleidbaarheid – middels een website – naar de betrokken onderzoekers. Deze website vermeldt (bewust) geen directe link met dierproeven. Daarnaast dienen enkele termen in het 'projectvoorstel' en in de 'bijlagen beschrijving dierproeven' geanonimiseerd te worden, omdat anders duidelijk wordt welk model wordt gebruikt. Dit model wordt in Nederland alleen door deze onderzoekers gebruikt, waardoor openbaarmaking direct leidt tot de (namen van de) betrokken onderzoekers.

De CCD heeft enkele zoekacties uitgevoerd met voornoemde gegevens en komt tot de conclusie dat deze gegevens eenvoudig leiden tot de betrokken onderzoekers. Deze gegevens over het gebruikte model komen veelvuldig voor in het 'projectvoorstel' en de 'bijlagen beschrijving dierproeven', waardoor de indruk wordt gewekt dat veel informatie wordt geweigerd. Dit is echter niet het geval, nu dezelfde informatie op meerdere plaatsen in de documenten voorkomt.

De vergunninghouder bij vergunning 2015328 heeft middels een zienswijze aangegeven dat het openbaar maken van de naam van vergunninghouder in relatie tot het onderzoeksproject onevenredig benadelend werkt, voor zowel de vergunninghouder als haar werknemers. De vergunninghouder verwijst hierbij naar de hiervoor reeds genoemde uitspraak van de Raad van State van 16 februari 2011 en naar de uitspraak van de rechtbank Den Haag van 26 februari 2016 (SGR 14/10530).

Zoals uit de recente uitspraken van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498) volgt, bestaat er nog altijd een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme. De vergunninghouder en haar personeel zijn nog steeds kwetsbaar voor dierenrechtenactivisten. Verwezen wordt naar de opsomming van incidenten onder het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer'.

Het is de vergunninghouder bij vergunning 2015340 bekend dat de dreiging van dierenrechtenextremisme nog onverminderd actueel is en zich in zowel nationaal als internationaal verband afspeelt. De vergunninghouder wijst op incidenten die in het recente verleden hebben plaatsgevonden. (Rechts)personen dienen hiertegen te worden beschermd. Om die redenen dienen persoonsnamen, de naam van vergunninghouder, locatieadressen en alle hiernaar herleidbare gegevens geanonimiseerd te worden, nu een gedeelte van deze gegevens

weliswaar middels een register openbaar zijn gemaakt, maar niet in relatie tot afzonderlijke projecten. Tevens dienen referenties naar eigen onderzoekers en onderzoeksgroepen te worden geanonimiseerd. Verwezen wordt naar de recente uitspraken van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498).

Zoals onder het kopje 'bedrijfs- en fabricagegegevens' is aangegeven, kunnen de context dan wel de bijzonderheden van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de vergunninghouder of de adviserende DEC reden zijn voor het weigeren van hun bedrijfsnamen (Rechtbank Gelderland van 21 april 2016, AWB 15/6463). De context geeft naar het oordeel van de CCD aanleiding voor het weigeren van de naam van de betreffende vergunninghouders (2015328 en 2015340) en de DEC (2015340).

De CCD is van oordeel dat onlangs inzichtelijk is gemaakt dat de betreffende instellingen recent het doelwit zijn geweest van dierenrechtenactivisten en dat er bij de betreffende instellingen een actueel risico bestaat dat de vergunninghouders het doelwit zijn van dierenrechtenactivisme. Er is sprake van actuele dreiging en intimidatie gericht op de betrokken derde belanghebbenden. Vanwege het risico op dierenrechtenactivisme concludeert de CCD dat het belang van openbaarmaking van de naam van de betreffende vergunninghouders en de hiernaar herleidbare gegevens in de opgevraagde documenten niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling door de openbaarmaking.

Daar waar in het projectvoorstel van vergunning 2015340 informatie is gelakt, betreft dit verwijzingen naar de instelling en samenwerkingsverbanden, waardoor direct herleidbaar is welke vergunninghouder het betreft. Inhoudelijke informatie is niet geweigerd. Daarnaast heeft de vergunninghouder verzocht om het weigeren van alle referenties in dit document, vanwege de feitelijke verwijzing naar personen en instellingen en de directe verwijzing naar personen en instellingen in deze context. De CCD is van oordeel dat, vanwege de directe herleidbaarheid, referenties naar eigen onderzoekers, eigen onderzoeksgroepen en nog niet gepubliceerde informatie geweigerd dienen te worden. Daar is in dit geval echter geen sprake van.

De DEC bij vergunning 2015340 heeft middels een recente zienswijze inzichtelijk gemaakt dat de naam- en adresgegevens van de DEC rechtstreeks herleidbaar zijn naar een natuurlijk persoon. Daarnaast hebben de personen van deze DEC in het verleden te maken gehad met acties van dierenrechtenactivisten en de vrees blijft bestaan dat er opnieuw gerichte acties plaatsvinden. Acties van dierenrechtenactivisten zijn niet altijd beperkt gebleven tot locaties waar de proeven worden uitgevoerd, maar hebben ook plaatsgevonden bij privéadressen van personen die betrokken waren bij dierproeven. Voorts is niet te voorspellen welke dierenrechtenactivisten tegen welk type dierproeven stelling zullen nemen. Hiermee is de CCD van oordeel dat het belang van openbaarmaking van de naam van deze DEC niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling en het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.



Voorkomen van fraude

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

Concurrentiegevoelige informatie

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

Voor wat betreft vergunning 2015326 heeft de vergunninghouder verzocht om enkele specifieke termen en daarmee samenhangende zinsdelen te weigeren. De CCD concludeert dat het hier gaat om door de vergunninghouder ontwikkelde 'labels', waarover nog niet eerder is gepubliceerd. Daarnaast gaat het om een nog niet eerder gepubliceerde samenstelling van voeding die de proefdieren krijgen. Deze samenstelling is bepalend voor het verdere verloop van het onderzoek. De CCD is van oordeel dat dit concurrentiegevoelige informatie betreft, omdat de specifieke 'labels' en samenstelling van de voeding essentieel zijn voor het onderzoek en het niet wenselijk is (voor de vergunninghouder ten opzichte van concurrenten) wanneer deze informatie reeds in dit stadium wordt geopenbaard.

Aangaande vergunning 2015327 heeft de vergunninghouder aangegeven dat bepaalde termen niet geopenbaard mogen worden, omdat deze de concurrentie op het juiste spoor helpen. Uit bepaalde termen blijkt welk model en welke lijnen er worden gebruikt en deze leiden naar één groep onderzoekers, omdat zij de enigen in Nederland zijn, die dit model gebruiken. Hieruit blijkt dat het uniek onderzoek betreft en voorkomen dient te worden dat het onderzoek in deze fase voor concurrenten reproduceerbaar wordt.

Zoals hiervoor onder 'herleidbaarheid' reeds is aangegeven, is de CCD van oordeel dat de betreffende informatie op basis van herleidbaarheid naar de betrokken onderzoekers dient te worden geweigerd. Daarnaast is er sprake van concurrentiegevoelige informatie, omdat het model en de lijnen slechts door één onderzoeksgroep worden gebruikt. Ook hier geldt dat de indruk wordt gewekt dat veel informatie wordt geweigerd, maar dat hier geen sprake van is, omdat veel informatie wordt herhaald. Dat is ook te zien aan dezelfde plaats in de tekst waar de gegevens worden geweigerd.

Voor wat betreft vergunning 2015328 heeft de vergunninghouder aangegeven dat de specifieke informatie over het te ontwikkelen product een beschrijving bevat van het nieuwe product en de toegevoegde waarde daarvan. Dit is informatie die inzicht geeft in de wijze waarop het nieuwe product wordt ontwikkeld. De verwijzingen naar door de vergunninghouder ingeschakelde derden geven inzicht in de strategie van de vergunninghouder om bepaalde onderdelen van onderzoeken uit te besteden. Deze strategie wordt door concurrenten nog niet gebruikt, maar wanneer zij inzicht krijgen in deze strategie, kunnen zij hun bedrijfsvoering hierop aanpassen, wat onevenredig voordeel oplevert.

Enkele definities, de inrichting van de dierproef, de omvang van de groepen dieren en de criteria voor humane eindpunten zijn voor de vergunninghouder unieke gegevens en geven weer op welke wijze de vergunninghouder haar onderzoek/bedrijfsproces heeft ingericht en wanneer dit in deze fase van het onderzoek reeds wordt geopenbaard, is dat onevenredig benadelend voor de vergunninghouder.

Hiervoor onder het kopje 'bedrijfs- en fabricagegegevens' is reeds aangegeven dat voornoemde informatie wordt geweigerd op grond van het zijn van bedrijfs- en fabricagegegevens. Voorts is de CCD van oordeel dat het onevenredig benadelend werkt voor de vergunninghouder wanneer bepaalde informatie reeds in deze fase van het onderzoek wordt geopenbaard. Dientengevolge werkt dit onevenredig bevoordelend voor concurrenten en dit acht de CCD niet wenselijk.

Tenslotte heeft de betreffende vergunninghouder verzocht om onderdeel H van de bijlage beschrijving dierproeven niet te openbaren, nu daarin wordt aangegeven dat de proefdieren pijn zullen ervaren. Dit blijkt volgens de vergunninghouder echter onjuist te zijn, omdat de pijn geheel wordt weggenomen door gebruik van anesthetica. Deze passage wekt een verkeerde indruk en leidt volgens de vergunninghouder tot onevenredige benadeling.

De CCD stelt vast dat de ongeriefinschatting van dieren die betrokken zijn bij dierproeven een vast onderdeel is van de ethische afweging die bij de beoordeling van een aanvraag plaatsvindt. Verwezen wordt naar onder meer artikel 10a2 lid 2 sub d van de Wod. De aanvraag dient om die reden inzicht te geven in de schade die de dieren tijdens het project ondervinden. Tevens dient de aanvraag informatie te bevatten over toegepaste pijnstilling. Uit de Wod volgt dat informatie over de ongeriefinschatting in de niet-technische samenvatting moet zijn opgenomen. Deze informatie is derhalve reeds openbaar gemaakt. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder op deze wijze niet onevenredig wordt benadeeld.

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

Voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad is het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend. Uit de uitspraak van de Raad van State van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) blijkt uit rechtsoverweging 2.2: *"Zoals eveneens volgt uit de geschiedenis van de totstandkoming van de Wob (Kamerstukken II 1986/1987, 19 859, nr. 3, blz. 14 en 38) en zoals de Afdeling evenzeer eerder heeft overwogen (onder meer in de uitspraak van 18 augustus 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BN4268), beoogt artikel 11, eerste lid, van de Wob ter bescherming van de vrije meningsvorming te verzekeren dat de bij ontwikkeling van beleid van een bestuursorgaan betrokken personen in alle vrijheid en in een vertrouwelijke sfeer hun gedachten en opvattingen kunnen uiten zonder vrees voor gezichtsverlies."*

Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en



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

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

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

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

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

De vergunninghouder bij NTS2015328 heeft middels een zienswijze aangegeven dat de e-mail van de CCD gericht aan de betrokken DEC niet geopenbaard mag worden nu in de e-mail inzicht wordt gegeven in de opvattingen van medewerkers van de CCD en de betrokken DEC. Deze e-mail is volgens de vergunninghouder opgesteld ten behoeve van intern beraad en bevat persoonlijke beleidsopvattingen.

De CCD is van oordeel dat de e-mail geen persoonlijke beleidsopvattingen ten behoeve van intern beraad bevat. In de e-mail wordt een terugkoppeling aan de DEC over het proces gegeven, maar worden er geen persoonlijke opvattingen weergegeven. Er wordt een vraag gesteld, maar die wordt in de betreffende e-mail niet beantwoord. Tenslotte is aangegeven dat de aanvraag wordt vergund en dat een voorwaarde wordt gesteld. Deze informatie wordt reeds openbaar gemaakt middels de beschikking en de vergunning.

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

Dwangsombesluit

Uit artikel 4:17 lid 3 van de Awb volgt dat de eerste dag waarover de dwangsom is verschuldigd, de dag is waarop twee weken zijn verstreken na de dag waarop de termijn voor het geven van de beschikking is verstreken en het bestuursorgaan van de aanvrager een schriftelijke ingebrekestelling heeft ontvangen.

Zoals hiervoor reeds onder 'ingebrekestelling' aangegeven, ontvingen wij uw ingebrekestelling op 18 augustus 2016. De eerste dag waarover wij u een dwangsom zijn verschuldigd, betreft 2 september 2016. Per 1 oktober 2016 is de Wet Dwangsom echter niet meer van toepassing op de Wob, waardoor 30 september 2016 de laatste dag betreft, waarover een dwangsom is verschuldigd.

Conform artikel 4:18 Awb stelt het bestuursorgaan binnen twee weken na de laatste dag waarover de dwangsom was verschuldigd de verschuldigdheid en de hoogte van de dwangsom bij beschikking vast. Op grond van artikel 4:17 lid 2 Awb bedraagt de dwangsom de eerste veertien dagen € 20,- per dag, de daaropvolgende veertien dagen € 30,- per dag en de overige dagen € 40,- per dag.

In uw geval wordt de dwangsom berekend over een periode die begint op 2 september 2016 en eindigt op de laatste dag dat de Wet Dwangsom van toepassing is op de Wob, te weten 30 september 2016. Wij kennen u hierbij een dwangsom van € 740,- – zegge zevenhonderdveertig euro – toe. Dit bedrag is als volgt tot stand gekomen: 14 dagen á € 20,- per dag + 14 dagen á €30,- per dag + 1 dag á € 40,- per dag maakt een totaalbedrag van € 740,-.

De bovenstaande dwangsom zal binnen zes weken na dagtekening van dit besluit op het door u aangegeven rekeningnummer worden overgemaakt.

Wijze van openbaarmaking

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

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



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

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Hoogachtend,

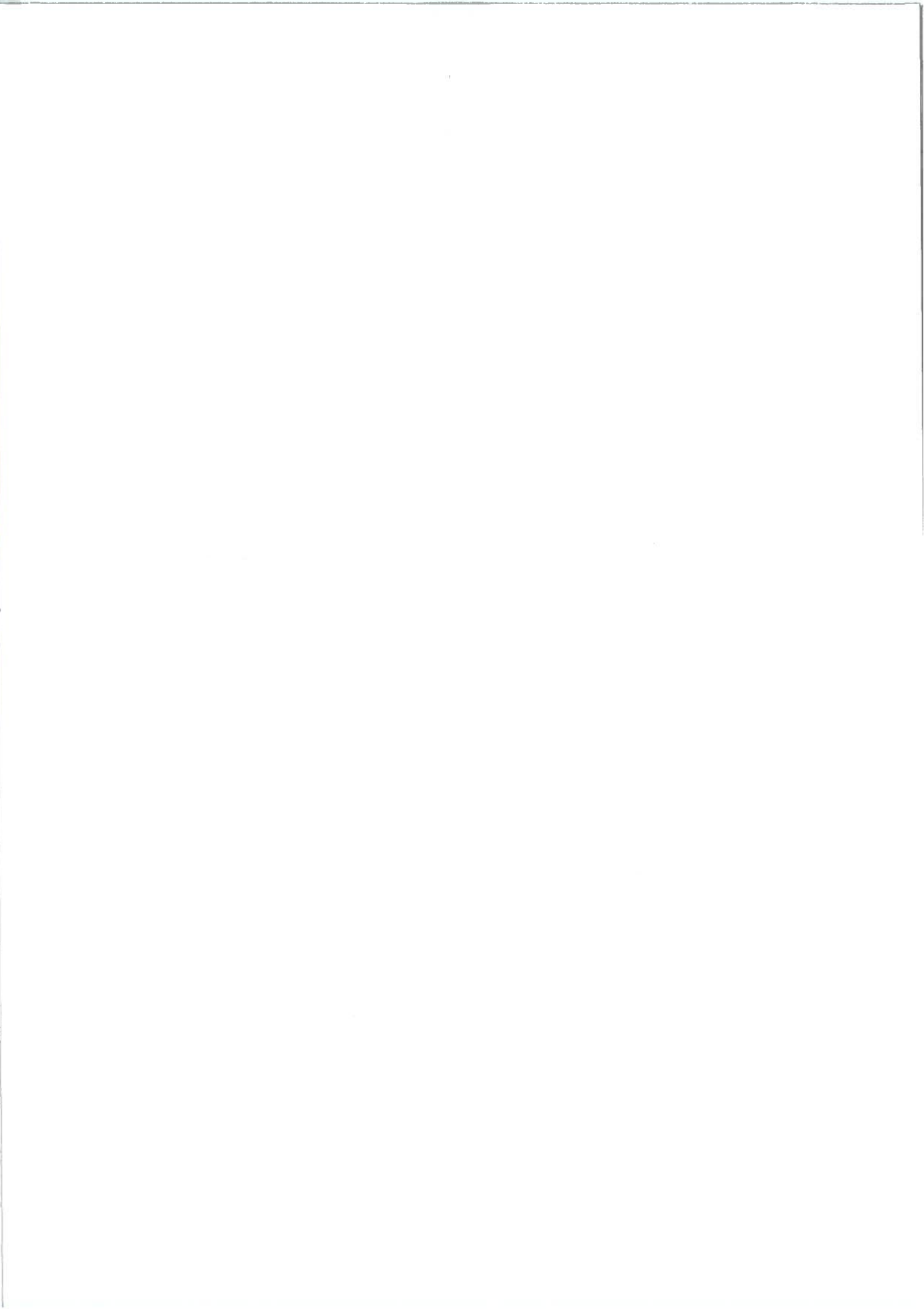
De Centrale Commissie Dierproeven,
namens deze,



Ir. J.F.M. Daemen
wnd. Algemeen Secretaris

Bezwaar

Indien u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift kunt u sturen naar de Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief. Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisend belang. Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.



Inventaris Wob-verzoek W16-09S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015321								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling I				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling I				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling II				x		x	x	
10	Mail DEC vragen				x		x	x	
11	Reactie verzoek aanvulling II				x		x	x	
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

24 NOV 2015



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, 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>Universiteit Maastricht</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><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg 4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50169181	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
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	50169181																	
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																	
1.3	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>																	
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>[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 | <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?
- The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het ontwikkelen van nieuwe therapieën/behandelingsmethoden om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen.
- 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 [redacted] 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | [redacted] |

4 Betaalgegevens

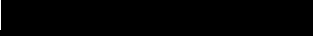
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 468,00
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde 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

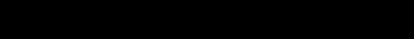
6 Ondertekening

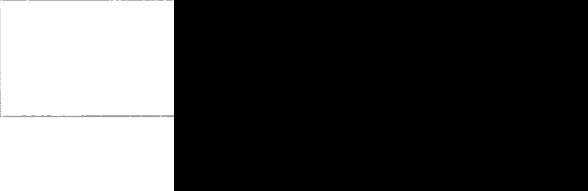
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende 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 

Functie 

Plaats Maastricht 

Datum 18-11-2015 

Handtekening 



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. In this study we will test new therapeutic interventions after fetal hypoxia-ischemia.

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 extracellular vesicles (EV)** 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 global 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 concentration 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.

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 outcomes.

Improve structural and functional brain injury with cell-based therapy

AIM a: To assess the temporal dynamics of the cerebral and peripheral immune response in the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury.

AIM b: To assess the role of the spleen in the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain injury.

AIM c: 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 d: Define the optimal dosing strategy for the most effective cell-based therapy.

AIM e: 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

Primary endpoint 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

Secondary endpoint Gut:

Necrotizing enterocolitis: 10-20% 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:

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 the aim to develop and improve new therapeutic strategies for the treatment of perinatal insults in well-established ovine model of global hypoxia-ischemia (HI).

Ovine fetal development, in terms of white matter development in the brain, 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 for hypoxia-ischemia model. In addition, the long gestational period (~147 days) allows for more precise timing of perinatal insults based on specific developmental processes.

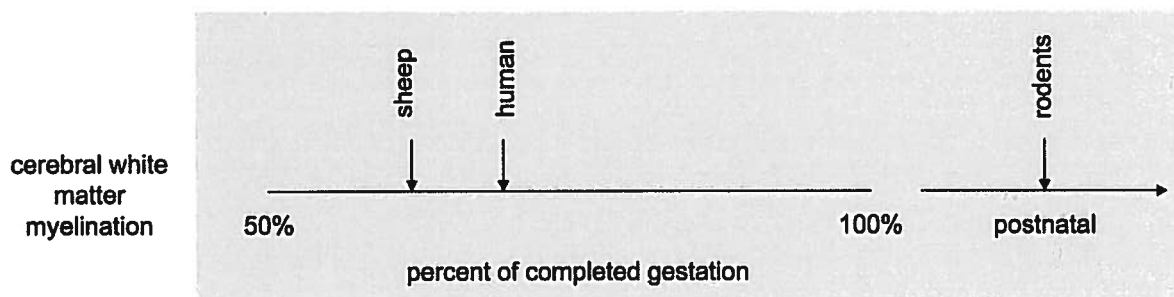


Figure 1 Brain development during gestation in humans, sheep and rodents.

The objective of this project is to develop novel treatment strategies to reduce the neurodevelopmental sequelae of the most common underlying pathology in preterm birth complicated by asphyxia. For this purpose, we generated the following main research question in this project:

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.

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.

The objective of this project is to develop therapeutic strategies to reduce the consequences of hypoxia-ischemia and brain injury of these threats and improve outcome in preterm infants.

In the model of HI we seek to improve structural and functional brain injury with cell-based therapy. 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 a**). AIM a 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 proving 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 b**) 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. AIM b 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 c**). AIM c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM b. 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 d**) and long-term treatment effects (**AIM e**) will be determined.

Go or no go's and milestones

AIM a 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 b 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 c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM B. However, if cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.

AIM d will be a milestone in determining the optimal dosing strategy that will be tested for long term effects in **AIM e**.

If our cell-based therapy has long-term effectiveness (**AIM e**), 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	Global hypoxia-ischemia
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 1	Type of animal procedure 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
1a	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	
1b	8	sham	SPLX	saline	N=12	N=96
				MARC	N=12	
			Sham SPLX	saline	N=12	

				MAPC	N=12	
		HI	SPLX	saline	N=12	
				MAPC	N=12	
			Sham SPLX	saline	N=12	
				MAPC	N=12	
1c	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	
1d	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
		HI	saline	N=6		
			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
1e	4	sham	saline	N=12	N=48	
			Superior therapy	N=12		
		HI	saline	N=12		
			Superior therapy	N=12		
SPLX = splenectomy; MSC = mesenchymal stem cells; EV = extracellular vesicles						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 the 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 placed 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% (AIM 1b) 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 minimize 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). **We found a reduction of convulsion as improvement of brain function by more than 40% with a standard deviation of 30%.**

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 40% ($\delta=40$) with a Standard deviation of 30% ($\sigma=30$) 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 1a-e) which will follow in logical order and which 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 labour

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 6 h not responding to fluid treatment

Indicate the likely incidence.

Based on previous experiments we have determined the incidence of reaching a human endpoint at 10%, 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

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, Kerckmar 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.

DEC-advies 2015-013

dd. 30-10-2015

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: 2015-013
2. Titel van het project: *The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia.*
3. Titel van de NTS: *Het ontwikkelen van nieuwe therapieën/behandelingsmethoden om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen.*
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC-UM
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon:
[REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - X ontvangen door DEC: 22-10-2015
 - X aanvraag compleet dd. 11-11-2015
 - X in vergadering besproken: 30-10-2015
 - anderszins behandeld
 - X termijnonderbreking(en) van tot 22-10-2015 tot 03-11-2015; 06-11-2015 tot 09-11-2015 tot; 10-11-2015 tot 11-11-2015; 11-11-2015 tot 16-11-2015.
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD

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 03-11-2015
- Strekking van de vragen:
 - 1) Titel dekt lading niet; het onderzoek vindt plaats bij schapenfoetussen en niet bij preterm baby's.
 - 2) Wat is de status van de gearceerde stukken tekst. Is de gearceerde tekst aan het eind van 3.1 een recente toevoeging? Het daarin beschreven onderzoek wordt niet in de doelen van 3.2 genoemd!
 - 3) De opbouw van de tekst is verwarrend/slordig. e.g.: In de laatste 7 tekstregels van 3.4.1 staat: "We will focus on the interaction between global hypoxia-ischemia and cell-based therapies". Twee regels verder wordt gesuggereerd dat ook een andere oorzaak van preterm birth pathology (namelijk chorioamnionitis) in het onderzoek betrokken wordt. Aansluitend: "For this purpose, we generated the following three main research questions in this project:" en vervolgens wordt er slechts één genoemd.
 - 4) AIM 1 verwijderen; er is geen AIM 2!
 - 5) Wat betekent EV in MAPC-EV en MSC-EV? Het ligt voor de hand dat het een afkorting is van "extracellular vesicles", maar het wordt nergens vermeld; EV komt alleen in de tabel van de Appendix voor onder A.
 - 6) De powerberekening is niet juist. Als $\sigma=40$ en $\delta=30$ dan is $n=27,9$ (volgens L.Sachs). Als de waarden van σ en δ zijn verwisseld, is de uitkomst van n wel 8,83. Maar dan is nog niet duidelijk op basis van welke read-out (outcome) δ en σ zijn gebaseerd. Het zal een van de primaire outcomes zijn. Structural brain injury (postmortem MRI's of immunohistochemische parameters) of brain function(EEG's). Blijkbaar wordt in alle experimenten dezelfde readout parameter gebruikt want de powerberekening geldt voor alle groepen. Maar welke is dan de readout parameter voor de gut-function? Of anders: is de spreiding van die parameter en het beoogd verschil ook gelijk aan 40 en 30 resp?
 - 7) Bij 3.4.3 aim 1c laatste zin, 'a' moet 'are' zijn.
- Datum antwoord 06-11-2015
- Strekking van de antwoorden; **Het PV was niet compleet aangeleverd.**
- **De DEC-UM heeft dd. 09-11-2015 verzocht de stukken compleet aan te leveren.**

- Datum antwoord 10-11-2015
- **De antwoorden hebben geleid tot correcte aanpassing van het projectvoorstel.**
De DEC-UM is echter niet tevreden over het aanpassen van de titel en heeft dd. 11-11-2015 nog de volgende vraag/opmerking gesteld:

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag. Echter de titel bevat nog steeds "preterm babies" in de Engelse titel en "vroeggeboortes" in de Nederlandse titel. Men zou hier graag het species hebben vermeld.

De DEC-UM vraagt zich af of het niet beter/correcter is om in de titel al aan te geven welk proefdier gebruikt wordt. Men begrijpt dat de onderzoekers in de titel al de valorisatie (het maatschappelijk belang) van hun onderzoek willen benadrukken, maar omdat het hier toch duidelijk om dierproeven gaat lijkt het zuiver om dat in de titel tot uitdrukking te brengen, bijvoorbeeld door het proefdier te vermelden.

- Datum antwoord 11-11-2015
De titel is correct aangepast.

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 vergunning plichtig (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 productiedoeleinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling: **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 van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd: **JA**

- Bedreigde diersoort (en) (10.e.4)
- Niet-menselijke primaten (10.e)
- Dieren in/uit het wild (10.f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10.h)
- Hergebruik (1.e.2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10.g)
- Toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- 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 en de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt 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 voordelen opleveren voor mens, dier of milieu.

Ethische afweging DEC-UM:

Het project "*The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia*", 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 vroeg geborenen 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 ernstig ongerief zullen ondervinden.

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, zoals oog voor het schaap als kuddedier. 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 "*The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia*" 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

X 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



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
AVD107002015321

Bijlagen

2

Datum 24 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002015321. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

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: 10700
Naam instelling of organisatie: Universiteit Maastricht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 50169181
Straat en huisnummer: Minderbroedersberg 4-6
Postbus: 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
IBAN: NL04INGB0679510168
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Maastricht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 december 2015
Geplande einddatum: 1 december 2020
Titel project: The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia
Titel niet-technische samenvatting: Het ontwikkelen van nieuwe therapieën behandelingsmethoden om de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij vroeggeboren lammeren te verminderen.
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616/[REDACTED] 6200 MD Maastricht
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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Maastricht

Datum:

18 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



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
AVD107002015321

Bijlagen

2

Datum 24 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 november 2015

Vervaldatum: 24 december 2015

Factuurnummer: 15700321

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002015321	€ 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

Universiteit Maastricht

Minderbroedersberg 4-6

Postbus 616

6200MD Maastricht



**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
AVD107002015321

Uw referentie

Bijlagen

Datum 17 december 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia' met aanvraagnummer AVD107002015321. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

- In uw aanvraag beschrijft u in de bijlage dierproeven met de hulp van een tabel verschillende experimentele groepen te willen opzetten. Het is voor ons niet duidelijk wat bedoelt u met "1 day, 3 days, 7 days" bij doel 1a. Wat gebeurt na 1, 3 of 7 dagen? Zou u de vermelde termijnen kunnen uitleggen, en ook de criteria waarop de keuze voor deze termijnen is gebaseerd?

- In de tabel bij groep 1d beschrijft u 2 tijdspunten (timing 1 en timing 2). Kunt u nog toelichten hoe u deze 2 tijdspunten definieert?

- Het is bekend dat schapen meer dan 1 lammetje kunnen krijgen. Voor ons is niet duidelijk of u alleen schapen die drachtig zijn van 1 lam includeert. Controleert u hiervoor? Zo nee, worden alle foetussen gebruikt? Zo nee, wat gebeurt het met de niet geopereerde lammetjes? Is hun ongerief meegewogen en hun aantal meegerekend? We zouden graag meer informatie hierover willen ontvangen.

Opsturen binnen veertien dagen

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

vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk **dinsdag, 22 december 2015**, uw antwoord aan ons te sturen.

Wanneer een beslissing

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



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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Maastricht, 18.12.2015

Your letter from 17.12.2015
Submission AVD107002015321

Highly esteemed members of the committee,

Thank you very much for your letter from 17.12.2015 concerning our project 'The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia' with number AVD107002015321.

We are happy to provide you the additional information that you request:

- In uw aanvraag beschrijft u in de bijlage dierproeven met de hulp van een tabel verschillende experimentele groepen te willen opzetten. Het is voor ons niet duidelijk wat bedoelt u met "1 day, 3 days, 7 days" bij doel 1a. Wat gebeurt na 1, 3 of 7 dagen? Zou u de vermelde termijnen kunnen uitleggen, en ook de criteria waarop de keuze voor deze termijnen is gebaseerd?

We want to analyse the time course of the changes that hypoxia-ischemia induce in the fetal brain at 1 day, 3 and 7 days and how the administered therapies affect the changes. We know from other animal models, that hypoxia-ischemia induces within the first day cell death of neurons and induction of pro-inflammatory cytokines. Within 3 days inflammatory cells from the blood are recruited into the brain. At 7 days, structural injury is present. We have published data on the changes at 7 days but have not studied earlier time points (Jellema et al., PLoS One, 2013). Therefore, we request the earlier time points at 1, 3 and 7 days based on the above mentioned rationale.

- In de tabel bij groep 1d beschrijft u 2 tijdstippen (timing 1 en timing 2). Kunt u nog toelichten hoe u deze 2 tijdstippen definieert?

The course of hypoxia-ischemia has several phases of injury: the acute injury as a direct result of oxygen shortage and hypoperfusion, the reperfusion injury (after blood supply and circulation starts again and the cells increase their metabolism again) and the chronic injury. Interventions have been tested in all phases. From clinical work and from our model we know that intervention immediately after the injury is beneficial but does not prevent the reperfusion or chronic injury. Therefore, we want to test the administration of the intervention at different time points to find out how we can optimise the therapeutic effect of our interventions in which phase of the injury process. The first dose of cells or cell-derived products will be given immediately after the hypoxic-ischemic event, the second dose will be tested in timing 1 early in the reperfusion phase (24h after the event) whereas in timing 2 the cells are administered at 72h after the hypoxic event.

- Het is bekend dat schapen meer dan 1 lammetje kunnen krijgen. Voor ons is niet duidelijk of u alleen schapen die drachtig zijn van 1 lam includeert. Controleert u hiervoor? Zo nee, worden alle foetussen gebruikt? Zo nee, wat gebeurt het met de niet geopereerde

lammetjes? Is hun ongerief meegewogen en hun aantal meegerekend? We zouden graag meer informatie hierover willen ontvangen.

We have been working for years with the same breeder and an associated veterinarian. The veterinarian scans the pregnant ewes during early and mid-gestation in order to determine the number of fetuses. Exclusively singleton pregnancies are used for our experiments in this project. Multiple pregnancies are used by us in the approved protocol AVD107002015225.

Please do not hesitate to contact me for any further information!

Yours sincerely,

[Redacted signature block]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Minderbroedersberg 4-6
Postbus 616
6200MD Maastricht



**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
AVD107002015321

Uw referentie

Bijlagen

Datum 19 januari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 20 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia' met aanvraagnummer AVD107002015321. 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 uw aanvraag beschrijft u een aantal keuzemomenten. De criteria op basis waarvan u zult besluiten te starten met het project, het onderzoek wel/niet te continueren en te starten met een volgende onderzoeksfase zijn echter niet in voldoende mate beschreven. U wordt verzocht deze criteria in meer detail te beschrijven. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

2) Uw project heeft als doel het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt. Om uw doelstelling te bereiken gaat u onder meer de effectiviteit van door MSCs geproduceerde extracellulaire vesicles in bescherming van de hersenen onderzoeken. Als onderbouwing hiervoor benoemt u het paracriene effect van MSCs op de modulatie van het immuunsysteem. Aangezien een dergelijk paracrien effect door zeer veel verschillende factoren gemedieerd kan worden, wordt u verzocht te beschrijven wat er bekend is over de rol van extracellulaire vesicles in immuunmodulatie. In aanvulling daarop wordt u verzocht nader toe te lichten waarom het volgens u aannemelijk dat MSCs via een paracrien effect bescherming geven aan de hersenen van pasgeborenen.

3) Bij de beoordeling van een aanvraag kijkt de CCD niet alleen naar de doelstelling van een aanvraag, maar ook naar de haalbaarheid van de doelstelling. Om de haalbaarheid van de doelstelling van uw project te kunnen beoordelen, heeft de CCD aanvullende informatie nodig over de te testen cel populaties en vesicles.

MSCs zijn zeer heterogeen. In uw aanvraag beschrijft u niet op welke wijze u MSCs en MAPCs gaat isoleren en of u deze nog moet expanderen om voldoende extracellulaire vesicles te kunnen isoleren. U wordt verzocht dit toe te lichten.

-Extracellulaire vesicles zijn ook zeer heterogeen, zowel qua functionaliteit, grootte en content. U wordt verzocht toe te lichten of bekend is welke subtypes extracellulaire vesicles geproduceerd worden door MSCs en wat het effect is van deze subtypes op verschillende celtypes en/of processen? In aanvulling daarop, wordt u verzocht aan te geven of u een specifieke subset van extracellulaire vesicles gaat isoleren en uw keuze te onderbouwen.

De CCD is van mening dat het belangrijk is om de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles te bepalen voordat in vivo experimenten worden uitgevoerd. Dit om te voorkomen dat onnodig dieren ernstig ongerief moeten ondergaan. U wordt verzocht aan te geven of en op welke wijze u de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles zult bepalen alvorens deze worden gebruikt in dierproeven.

4) Is bekend of transplantatie van humane MSCs in een schaap leidt tot ongewenste bijeffecten die het resultaat van de proef kunnen beïnvloeden?

5) De CCD vraagt zich af of het voor het behalen van de doelstelling van dit project, het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt, noodzakelijk is om te onderzoeken of het beschermende effect van MSCs wordt gemedieerd door de milt? U verzocht nader toe te lichten waarom u dit noodzakelijk acht. U wordt daarnaast verzocht om aan het geven of u andere methoden heeft overwogen die minder ongerief induceren en waarom u deze niet geschikt acht.

6) In uw projectvoorstel meldt u andere 'targets' te willen onderzoeken indien de rol van de milt op het brein in hypoxic-ischemie niet kan worden bewezen. Welke andere 'targets' verwacht u te onderzoeken en kunt u de hypothese hierachter nader toelichten? Kunt u voor de voorliggende projectaanvraag duidelijker uitwerken wat de keuzemomenten zijn om het onderzoek met andere 'targets' voort te zetten?

Extern advies

Op basis van artikel 18, lid 3 van de Wet op de Dierproeven kan de CCD inhoudelijk advies vragen aan een onafhankelijke externe partij. De CCD wil gebruik maken van deze mogelijkheid om aan een internationale deskundige enkele vragen te stellen over uw aanvraag. Met het oog op concurrentie binnen uw onderzoeksveld, verzoeken wij u aan te geven welke onderzoekers NIET mogen worden benaderd.

Opsturen binnen veertien dagen

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

vergadering te kunnen bespreken verzoeken we u vriendelijk om uiterlijk **vrijdag, 22 januari 2016**, uw antwoord aan ons te sturen.

Wanneer een beslissing

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



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

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 19 januari 2016 17:02
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD107002015321

Geachte DEC,

De CCD heeft de volgende vragen aan de aanvrager gesteld:

1) In uw aanvraag beschrijft u een aantal keuzemomenten. De criteria op basis waarvan u zult besluiten te starten met het project, het onderzoek wel/niet te continueren en te starten met een volgende onderzoeksfase zijn echter niet in voldoende mate beschreven. U wordt verzocht deze criteria in meer detail te beschrijven. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

2) Uw project heeft als doel het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt. Om uw doelstelling te bereiken gaat u onder meer de effectiviteit van door MSCs geproduceerde extracellulaire vesicles in bescherming van de hersenen onderzoeken. Als onderbouwing hiervoor benoemt u het paracriene effect van MSCs op de modulatie van het immuunsysteem. Aangezien een dergelijk paracrien effect door zeer veel verschillende factoren gemedieerd kan worden, wordt u verzocht te beschrijven wat er bekend is over de rol van extracellulaire vesicles in immuunmodulatie. In aanvulling daarop wordt u verzocht nader toe te lichten waarom het volgens u aannemelijk dat MSCs via een paracrien effect bescherming geven aan de hersenen van pasgeborenen.

3) Bij de beoordeling van een aanvraag kijkt de CCD niet alleen naar de doelstelling van een aanvraag, maar ook naar de haalbaarheid van de doelstelling. Om de haalbaarheid van de doelstelling van uw project te kunnen beoordelen, heeft de CCD aanvullende informatie nodig over de te testen cel populaties en vesicles. MSCs zijn zeer heterogeen. In uw aanvraag beschrijft u niet op welke wijze u MSCs en MAPCs gaat isoleren en of u deze nog moet expanderen om voldoende extracellulaire vesicles te kunnen isoleren. U wordt verzocht dit toe te lichten.

-Extracellulaire vesicles zijn ook zeer heterogeen, zowel qua functionaliteit, grootte en content. U wordt verzocht toe te lichten of bekend is welke subtypes extracellulaire vesicles geproduceerd worden door MSCs en wat het effect is van deze subtypes op verschillende celtypes en/of processen? In aanvulling daarop, wordt u verzocht aan te geven of u een specifieke subset van extracellulaire vesicles gaat isoleren en uw keuze te onderbouwen. De CCD is van mening dat het belangrijk is om de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles te bepalen voordat in vivo experimenten worden uitgevoerd. Dit om te voorkomen dat onnodig dieren ernstig ongerief moeten ondergaan. U wordt verzocht aan te geven of en op welke wijze u de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles zult bepalen alvorens deze worden gebruikt in dierproeven.

4) Is bekend of transplantatie van humane MSCs in een schaap leidt tot ongewenste bijeffecten die het resultaat van de proef kunnen beïnvloeden?

5) De CCD vraagt zich af of het voor het behalen van de doelstelling van dit project, het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt, noodzakelijk is om te onderzoeken of het beschermende effect van MSCs wordt gemedieerd door de milt? U wordt verzocht nader toe te lichten waarom u dit noodzakelijk acht. U wordt daarnaast verzocht om aan het geven of u andere methoden heeft overwogen die minder ongerief induceren en waarom u deze niet geschikt acht.

6) In uw projectvoorstel meldt u andere 'targets' te willen onderzoeken indien de rol van de milt op het brein in hypoxic-ischemie niet kan worden bewezen. Welke andere 'targets' verwacht u te onderzoeken en kunt u de hypothese hierachter nader toelichten? Kunt u voor de voorliggende projectaanvraag duidelijker uitwerken wat de keuzemomenten zijn om het onderzoek met andere 'targets' voort te zetten?

Bovendien wil de CCD aan een internationale deskundige enkele vragen stellen over deze aanvraag. Op basis van artikel 18, lid 3 van de Wet op de Dierproeven kan de CCD inhoudelijk advies vragen aan een onafhankelijke externe partij.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dear members of the CCD,

Please excuse the delay in providing you the requested information. The principal investigator ([REDACTED]) is a neonatologist, who takes care of preterm babies and was on clinical service. Please find the information in the enclosure:

Onduidelijkheden

1) In uw aanvraag beschrijft u een aantal keuzemomenten. De criteria op basis waarvan u zult besluiten te starten met het project,

We are waiting for the approval by the CCD.

het onderzoek wel/niet te continueren en te starten met een volgende onderzoeksfase zijn echter niet in voldoende mate beschreven. U wordt verzocht deze criteria in meer detail te beschrijven. Deze vraag wordt gesteld om te voorkomen dat onnodig dieren gebruikt worden.

The criteria are as follows:

Aim a: The time course identifies what happens when. This is necessary to time the experiments. There is no decision making involved.

Aim b: This tests whether the spleen plays a role. The role of the spleen has been studied and suggested in other brain injuries (Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, *et al.*: The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis* 2012, 27:131-41; Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, *et al.*: Splenic atrophy in experimental stroke is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006, 176:6523-31).

If we find that the spleen does not play a role in the preterm brain, we

will pursue other targets. We refer with targets to possible mechanisms such as interferon gamma signalling: Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, *et al.*: The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis* 2012, 27:131-41 and the work of Seifert HA, Collier LA, Chapman CB, Benkovic SA, Willing AE, Pennypacker KR: Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014, 9:679-89), has identified interferon gamma as a possible "culprit" for the adverse outcome after stroke. We have further developed this concept and studied targets of the interferon gamma pathway and targets that can prevent the activation of this. Interferon gamma production can be taken over by other non-spleen cells. These targets are not part of this animal project.

AIM c will be a milestone in terms of determining the superior cell-based therapy based on the outcome parameters determined in AIM B. The decision making will be based on brain function, inflammation, structure. If cell-based therapies are not effective we will put future experiments on hold.

AIM d will be a milestone in determining the optimal dosing strategy that will be tested for long term effects in AIM e. The readouts are improved brain function, better structure preservation and less inflammation.

- The applicant has a unique track record of doing animal experiments and has served as a DEC member at the University of Maastricht. He completely agrees with the quest of the CCD to reduce the number of animals. There is another aspect beside the ethical dimension: Given the extremely high costs of the animal model, every animal that is not necessary is of measurable benefit to him.

2) Uw project heeft als doel het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt. Om uw doelstelling te bereiken gaat u onder meer de effectiviteit van door MSCs geproduceerde extracellulaire vesicles in bescherming van de hersenen onderzoeken. Als onderbouwing hiervoor benoemt u het paracriene effect van MSCs op de modulatie van het immuunsysteem. Aangezien een dergelijk paracrien effect door zeer veel verschillende factoren gemedieerd kan worden, wordt u verzocht te beschrijven wat er bekend is over de rol van extracellulaire vesicles in immuunmodulatie. In aanvulling daarop wordt u verzocht nader toe te lichten waarom het volgens u aannemelijk dat MSCs via een paracrien effect bescherming geven aan de hersenen van pasgeborenen.

These are very interesting questions that reflect the current state of scientific discussion. The applicant is a co-author of the position paper on the clinical introduction of extracellular vesicles which is attached as appendix 1. The basis of the hypothesis has been tested in rats which are a model of brain injury for term born babies [Doepfner TR, Herz J, Gorgens A et al. Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression. Stem Cells Transl Med. 2015;4:1131-1143]. Since there is a developmental difference between preterm and term brain structure and function, we cannot use the above mentioned paper as a proof of principle for the quest to develop a therapy for PRETERM babies.

3) Bij de beoordeling van een aanvraag kijkt de CCD niet alleen naar de doelstelling van een aanvraag, maar ook naar de haalbaarheid van

de doelstelling. Om de haalbaarheid van de doelstelling van uw project te kunnen beoordelen, heeft de CCD aanvullende informatie nodig over de te testen cel populaties en vesicles.

MSCs zijn zeer heterogeen. In uw aanvraag beschrijft u niet op welke wijze u MSCs en MAPCs gaat isoleren en of u deze nog moet expanderen om voldoende extracellulaire vesicles te kunnen isoleren. U wordt verzocht dit toe te lichten.

The MAPCs are a Federal Drug Administration approved stem cell product. MAPCs are a patented, adult-derived “off-the-shelf” stem cell product platform, for multiple disease indications in the areas of neurological, cardiovascular disease, inflammatory and immune disease, as well as other areas. There are currently six clinical stage programs – including a Phase 2 study in ischemic stroke, a Phase 2 clinical study for the treatment of damage from acute myocardial infarction, a exploratory clinical study in Acute Respiratory Distress Syndrome, and several others.

MSCs have been used and studied by us. The source, culture, quality control is described in appendix 2 in which the results are published.

-Extracellulaire vesicles zijn ook zeer heterogeen, zowel qua functionaliteit, grootte en content. U wordt verzocht toe te lichten of bekend is welke subtypes extracellulaire vesicles geproduceerd worden door MSCs en wat het effect is van deze subtypes op verschillende celtypes en/of processen? In aanvulling daarop, wordt u verzocht aan te geven of u een specifieke subset van extracellulaire vesicles gaat isoleren en uw keuze te onderbouwen.

The extracellular vesicles are produced as follows:

Human bone marrow-derived MSCs were raised from bone marrow donors after informed consent according to the Declaration of Helsinki as described previously. Briefly, MSCs were expanded in MSC basal media (Pan Biotech, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% human thrombocyte lysate, 1% glutamine, and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Their MSC nature was confirmed by flow cytometry with fluorescent labeled anti-CD44, anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105 and anti-CD146 antibodies as positive markers as well as with by anti-CD14, anti-CD31 and anti-CD45 antibodies as negative controls. In addition their osteogenic and adipogenic differentiation potential was confirmed in conventional MSC differentiation assays. MSC-EVs were harvested from MSC-conditioned media which were collected from passage 3 onwards, exactly as described before. Briefly, media exchanges were performed every 48 hours. MSC-conditioned media were passed through a 0.22 µm filter membrane (TPP, Trasadingen, Switzerland) and stored at -20°C until usage. Upon processing all conditioned media samples were thawed and processed at once. After adding polyethylene glycol (PEG) and NaCl to a final concentration of 10% PEG 6000 (v/v) and 75 mM NaCl over-night incubation at 4°C, MSC-EVs were concentrated by low speed centrifugation (30 min at 1,500 g). Pellets were washed in 0.9% NaCl twice and resuspended in 0.9% NaCl. MSC-EVs were stored as aliquots of 1 mL, each containing the MSC-EV equivalents harvested from the 48 h conditioned media of 4×10^7 cells. Aliquots were stored at -80°C until usage. The obtained MSC-EV fraction was characterized as presented in by Nanoparticle Tracking Analyses (NTA) and Western Blot (Supplementary figure 1) as described previously. Briefly, protein concentrations were determined by the micro BCA assay (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Germany). 5 µg of the concentrated MSC-EVs were treated with sample buffer (DTT, 0.1% SDS, 0.1 M Tris HCl, pH 7.0) and boiled for 5 min at 95°C. Samples were separated on 12% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Membranes were blocked in 5% skimmed milk in PBS followed by incubation with antibodies recognizing Tsg101 (Sigma-Aldrich) or CD81 (BD). Subsequently, membranes were incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies (Dianova, Hamburg, Germany).

Visualization was accomplished by enhanced chemiluminescence (Thermo Fisher Scientific).

Furthermore, it was negatively tested for the presence of bacteria, viruses and endotoxins.

This protocol is in line with the position paper in appendix 1, of which the principal investigator is a co-author.

De CCD is van mening dat het belangrijk is om de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles te bepalen voordat in vivo experimenten worden uitgevoerd. Dit om te voorkomen dat onnodig dieren ernstig ongerief moeten ondergaan. U wordt verzocht aan te geven of en op welke wijze u de kwaliteit en functionaliteit van de geïsoleerde extracellulaire vesicles zult bepalen alvorens deze worden gebruikt in dierproeven.

Please see above, appendix 1 and the technical description above.

4) Is bekend of transplantatie van humane MSCs in een schaap leidt tot ongewenste bijeffecten die het resultaat van de proef kunnen beïnvloeden?

No adverse events have been described. Please see our publication in appendix 2 for our own experience.

5) De CCD vraagt zich af of het voor het behalen van de doelstelling van dit project, het ontwikkelen van een therapie waarmee de gevolgen van hersenschade als gevolg van zuurstoftekort bij pasgeborenen kan worden beperkt, noodzakelijk is om te onderzoeken of het beschermende effect van MSCs wordt gemedieerd door de milt? U verzocht nader toe te lichten waarom u dit noodzakelijk acht. U wordt daarnaast verzocht om aan het geven of u andere methoden heeft overwogen die minder ongerief induceren en waarom u deze niet geschikt acht.

The role of the spleen has been studied and suggested in other brain injuries (Seifert HA, Leonardo CC, Hall AA, Rowe DD, Collier LA, Benkovic SA, *et al.*: The spleen contributes to stroke induced neurodegeneration through interferon gamma signaling. *Metab Brain Dis* 2012, 27:131-41; Offner H, Subramanian S, Parker SM, Wang C, Afentoulis ME, Lewis A, *et al.*: Splenic atrophy in experimental stroke

is accompanied by increased regulatory T cells and circulating macrophages. *J Immunol.* 2006, 176:6523-31).

However, the aim of every medical therapy is to UNDERSTAND why it works. If we determine the role of the spleen we can optimize the therapy. The therapy that we develop will be only available in high income countries. If we understand why it works and we can come up with a cheaper, possibly simpler therapy, we can help preterm babies that do not have the privilege to be born in high income countries.

6) In uw projectvoorstel meldt u andere 'targets' te willen onderzoeken indien de rol van de milt op het brein in hypoxic-ischemie niet kan worden bewezen. Welke andere 'targets' verwacht u te onderzoeken en kunt u de hypothese hierachter nader toelichten? Kunt u voor de voorliggende projectaanvraag duidelijker uitwerken wat de keuzemomenten zijn om het onderzoek met andere 'targets' voort te zetten?

As indicated in the reply to your first question, the role of cytokines is crucial after hypoxia-ischemia. The work of Seifert HA, Collier LA, Chapman CB, Benkovic SA, Willing AE, Pennypacker KR: Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014, 9:679-89, has identified interferon gamma as a possible "culprit" for the adverse outcome after stroke. We have further developed this concept and studied targets of the interferon gamma pathway and targets that can prevent the activation of this. The testing of the targets in animal research IS NOT PART of this animal ethics application.

Extern advies

Op basis van artikel 18, lid 3 van de Wet op de Dierproeven kan de CCD inhoudelijk advies vragen aan een onafhankelijke externe partij. De CCD wil gebruik maken van deze mogelijkheid om aan een internationale deskundige enkele vragen te stellen over uw aanvraag. Met het oog op concurrentie binnen uw onderzoeksveld, verzoeken wij u aan te geven welke onderzoekers NIET mogen worden benaderd.

The principal investigator embraces this idea - if it does not result in further delay. The principal investigator has no objections with respect to the choice of reviewer.

This model is not only unique in the Netherlands but in the Western hemisphere. The only other place where this model is available is Auckland, New Zealand. This sheep model has been essential for the development of hypothermia in term babies which has been successfully introduced into clinical care. Recent estimates identified a health benefit of equivalent to 250 million Euro per year by hypothermia. The external reviewer will hopefully convince the CCD that this research is scientifically sound (as already confirmed by the DEC at the University of Maastricht), necessary and instrumental to serve the most vulnerable patients that have no lobby to work for them. In addition, this work is carried out by people who have a track record of innovative translational research.

Sincerely,

[Redacted signature]

[Redacted signature]



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
Minderbroedersberg 4-6
Postbus 616
6200MD Maastricht

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.centralecommissiedierproeven.nl

0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl
Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD107002015321

Datum **03 FEB. 2016**
 Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Bijlagen

1

Geachte [REDACTED]

Op 20 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia" met aanvraagnummer AVD107002015321. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 december 2015 en op 24 januari 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD met betrekking tot de in de aanvraag vermelde behandeltermijnen en de vooraf controle op eenlingszwangerschap beantwoord. U heeft de keuzemomenten uitgewerkt, meer informatie over de selectieprocedure van de te gebruiken therapieën gegeven, en de rol van de milt in de door u gestelde hypothese meer toegelicht.

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: een opschortende voorwaarde, en een algemene voorwaarde die de CCD stelt aan meerjarige projecten om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10a. lid 1 van de wet.

U beschrijft in uw aanvraag dat wanneer effectiviteit van cell-based therapie niet bewezen kan worden verdere experimenten, deel D en deel E, niet worden uitgevoerd. Gezien de complexiteit van deze aanvraag en het cumulatief ernstige ongerief dat de dieren ondervinden verbindt de CCD een opschortende voorwaarde aan de vergunning. Deze voorwaarde bestaat hieruit, dat de CCD na de uitvoer van deel A t/m deel C een voortgangsrapportage van u ontvangt. Deze rapportage bestaat uit een welzijnsevaluatie en resultaten op basis waarvan u besluit het project voort te zetten of te stoppen. Wanneer u mogelijkheden ziet om de proefopzet te verfijnen of het ongerief voor de dieren te verminderen hoort de commissie dit ook graag van u. U kunt alleen dan uw project voortzetten wanneer de CCD kennis heeft genomen van uw rapportage en ingestemd heeft met voortzetting van uw project. Deze instemming kan worden verkregen met behulp van een besluit op een ingediende wijzigingsaanvraag.

U kunt met uw project "The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia" starten, met de delen A t/m C. De vergunning wordt afgegeven van 3 februari 2016 tot en met 1 december

2020, onder de opschortende voorwaarde zoals hierboven beschreven. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de datum in de aanvraag in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 oktober 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd.

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.

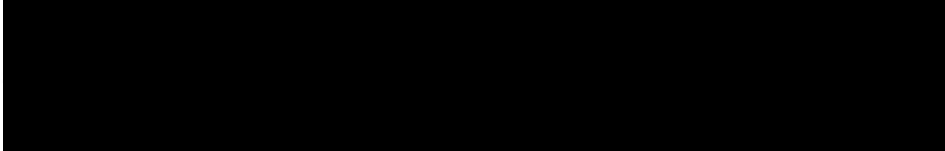
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



I. 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: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 februari 2016 tot en met 1 december 2020, voor het project "The development of new therapies and treatment strategies to reduce the brain injury of preterm lambs as a result of hypoxia" met aanvraagnummer AVD107002015321, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 oktober 2015, ontvangen op 24 november 2015;
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 december 2015 en op 24 januari 2016

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Global hypozia-ischemia	Schapen (Ovis aries) / Texel schapen; drachtige oaien en foetussen	840	Ernstig / severe	420 drachtige oaien en 420 foetussen.

Voorwaarden

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

1) De CCD ontvangt van u een voortgangsrapportage na de uitvoer van deel A t/m deel C. Deze rapportage bestaat uit een welzijnsevaluatie en resultaten op basis waarvan u besluit het project voort te zetten of te stoppen. Het project mag pas worden voortgezet na instemming van de CCD.

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

Voorschriften

Omdat de dieren ernstig ongerief ondervinden is er een beoordeling achteraf bij deze aanvraag vereist. Deze moet binnen één jaar na de afloop van de vergunning plaatsvinden.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.. Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

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

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

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

Inventaris Wob-verzoek W16-09S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015322								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x		x	x	
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6				x		x	x	
10	DEC-advies				x		x	x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
12	Verzoek aanvulling				x		x	x	
13	Reactie verzoek aanvulling I				x		x	x	
14	Reactie verzoek aanvulling II				x		x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	

2

2-6 NOV. 2015

AVB 115002015322



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

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 1 . 2 0 1 6 |
| Einddatum | 3 1 . 1 2 . 2 0 2 0 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune respons
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe behandelmethoden voor schadelijke afweerreacties
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens


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


5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

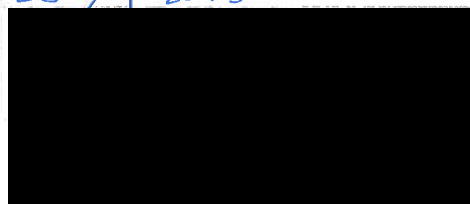
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende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

Naam 

Functie 

Plaats *Utrecht*

Datum *23-11-2015*

Handtekening 



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.

The immune system is a double-edged sword. While the immune system provides protection from pathogens and cancerous cells, excessive immune responses can lead to auto-immunity or exacerbated tissue damage during infection. To ensure optimal immune function, stimulatory and inhibitory signals must be balanced.

Modulation of inhibitory immune signalling has recently been recognised for its tremendous potential in the treatment of cancer (Breakthrough of the Year 2013, Science). Antibody-mediated blocking of the inhibitory immune receptors PD-1 and CTLA-4 to stimulate the anti-tumour immune response enhances the survival of cancer patients (Pardoll, Nat. Immunol., 2012). This demonstrates the potency of inhibitory immune receptors for the beneficial modulation of immune responses in disease. Contrary to cancer, where disease results from an inadequate immune response that fails to clear cancerous cells, auto-immune diseases, such as systemic lupus erythematosus, and multiple severe viral respiratory infections, including respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis and lower respiratory tract infections by influenza virus, are characterised by exaggerated immune responses that induce or exacerbate disease. Here too, inhibitory immune receptors represent promising therapeutic targets. However, rather than using antagonistic antibodies, agonistic agents could be employed to reduce excessive immune cell activity.

In this project, we will study the underlying biology of inhibitory immune receptors and apply the obtained knowledge to evaluate their potential as therapeutic targets in immune-mediated diseases to dampen injurious immune responses. Over the years, our work has focused on multiple inhibitory immune receptors,

Immune inhibitory receptors are differentially expressed among leukocytes, where expression is determined by both cell type and activation state, and employ varying modes of action to achieve suppression. Consequently, the role and therapeutic potential of inhibitory immune receptors varies per disease.

For instance, in severe respiratory infections such as respiratory syncytial virus infection-induced bronchiolitis, a massive neutrophil infiltration of the airways dominates the immune pathology in the lungs of patients. To suppress neutrophil-induced lung injury, an inhibitory immune receptor expressed by airway-infiltrated neutrophils is a prime target.

Hence, we will investigate the role of various inhibitory immune receptors in multiple immune-mediated disease settings.

Currently, the vast majority of research on the therapeutic capabilities of inhibitory immune receptors focusses on receptor blockade to increase anti-

tumour activity, whereas little to no research is published that addresses the potential of stimulating inhibitory receptors with agonists to prevent immune-induced pathology. We have shown that [REDACTED] (unpublished data). Thus, these inhibitory receptors dampen injurious lung inflammation. We therefore hypothesize that engaging inhibitory immune receptors, [REDACTED], with agonists may ameliorate immunopathology in viral respiratory diseases. Moreover, signaling by inhibitory immune receptors is thought to be critical to preventing autoimmunity and allergy. Indeed, mice deficient for inhibitory receptors are often prone to autoimmune diseases and inhibitory receptors can suppress allergic reactions in mice (Olde Nordkamp *et al.*, *Clinical Immunology*, 2013; Harvima *et al.*, *J Allergy Clin Immunol*, 2014). The capability of inhibitory immune receptors to regulate autoimmunity suggest that agonists of inhibitory receptors could alleviate the disease severity or possibly even stave off the progression of autoimmune diseases. However, experimental evidence that agonists of inhibitory receptors can mitigate disease is currently wanting.

In this project, we aim to provide proof-of-concept for agonists of inhibitory immune receptors as a therapy for immune-mediated diseases. To this end, we will use genetically modified mice to study the biological role of various inhibitory receptors, [REDACTED] in immune-mediated diseases. For those inhibitory immune receptors that we find to impact disease, we will develop agonists to test their efficacy in reducing immune pathology in these disease models. In particular, we will examine inhibitory receptors in the context of respiratory viral infections, including respiratory syncytial virus and influenza virus infection, house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma, and systemic lupus erythematosus. **New inhibitory receptor agonists will be generated in collaboration with the in house antibody facility of the UMC Utrecht, i.e. UMaB, which has the required ethical approval for the use of animals to generate new antibody clones.**

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 aim of this project is to improve our knowledge of inhibitory immune receptors and to apply this knowledge to obtain relevant preclinical evidence that inhibitory immune receptors represent promising therapeutic targets to dampen excessively injurious immune responses.

At the completion of the allotted project duration, we will have assessed the potential role of several inhibitory receptors in multiple disease models. To achieve this, our specific aims are to:

- Determine which inhibitory immune receptors play a role in multiple immune-mediated disease models (i.e. respiratory viral infection, house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma, and systemic lupus erythematosus).
- Functionally (*in vitro*) and phenotypically characterize the genetically modified mice to be used in disease models (compared to wild-type mice), in particular relating to immune parameters.
- Generate agonistic antibodies to inhibitory immune receptors that have been shown to limit disease *in vivo* and characterize these antibodies *in vivo*, for instance to determine whether they induce (unwanted) depletion effects.
- Establish a novel experimental mouse model for the induction of asthma based on relevant environmental triggers and genetic susceptibility, namely house dust mite and respiratory syncytial virus in mice deficient for the human asthma susceptibility gene, [REDACTED]
- Test the inhibitory immune receptor agonists in the various disease models for amelioration of disease. Agonists for specific inhibitory receptors will be tested in those disease models for which an worsening of disease was observed when that particular receptor was genetically ablated.

The complementary use of patient material and well-defined animal models will ensure the successful completion of this project (Salimi *et al.*, Crit Care Med, 2013). Our research group has long-standing experience investigating inhibitory receptors [REDACTED]. Relevant animal models, such as respiratory viral infection of mice, are up-and-running in our laboratory [REDACTED]. Several promising agonistic and antagonistic antibodies [REDACTED] are already being developed in collaboration with the in-house antibody facility of the UMC Utrecht, UMaB. Future agonistic antibodies against other inhibitory receptors will similarly be developed in collaboration with UMaB, **which has the required ethical approval for the use of animals to generate new antibody clones**. Work relating to house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma will be performed as member of a consortium. Collaborators in the consortium will provide mice genetically susceptible to bronchial hyperresponsiveness. Combined, these factors guarantee practicability of the proposed project.

Thus, the overarching aim of the project is to obtain proof of concept for inhibitory immune receptors as therapeutic targets for immune-mediated diseases. To achieve this, established mouse models for viral respiratory infection and systemic lupus erythematosus will be used. Herein, mice are treated with newly developed and tested inhibitory receptor agonists after an biological role for the inhibitory receptor in the disease has been demonstrated in genetic knockout (or antagonist-treated) mice. In addition, a new asthma model based on relevant genetic susceptibility and environmental triggers will be developed (current models focus on ovalbumin as allergen, but this is not a relevant human allergen in asthma). Subsequently, inhibitory receptor agonist can also be tested in the new asthma model for alleviation of disease. (See also the schematic overview of the project in subsection 3.4.3 on page 9). For all disease models in this project, the final goal is to show amelioration of disease by treatment with inhibitory receptor agonists.

3.3 Relevance

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

Numerous prevalent diseases, including respiratory syncytial virus infection-induced bronchiolitis, asthma, and systemic lupus erythematosus, are characterised by excessive and injurious immune responses. These diseases place tremendous burden on individual patients and society at large. In this project, we will examine the role of inhibitory receptors in these diseases and their potential as therapeutic target.

Respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis is the second most important cause of death during infancy, following malaria, in the developing world, claiming an estimated 250,000 lives annually. In the developed world, 1-2% of infants are admitted in hospital with respiratory syncytial virus bronchiolitis; therefore it is the foremost cause of infant hospitalization during the winter season. Severe bronchiolitis is linked to impaired lung function in adulthood and causally implicated in the onset of recurrent wheezing and asthma [REDACTED]. Overly strong, injurious immune responses are also seen in other respiratory viral infections. For instance, exaggerated (innate) immune responses are a hallmark of highly pathogenic influenza virus infections. A number of antivirals for respiratory syncytial virus have entered clinical trials. However, bronchiolitis patients already have high, and declining, viral loads when they are admitted to the intensive care. Since immune-mediated injury to the lungs persists, by itself an antiviral may provide limited benefit. Similar to how oseltamivir must be administered within 36 to 48 hours after symptom onset to be effective against influenza. Targeting inhibitory immune receptors with agonists represents a novel therapeutic approach that could limit immunopathology in severe viral respiratory infections. To obtain proof-of-concept for this approach, will test newly developed agonists of inhibitory receptors in previously published, well-defined mouse models of viral respiratory infection [REDACTED].

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a multisystem, autoimmune disorder with a wide range of clinical features, including involvement of the kidneys, heart, skin, joints, and nervous system. It has a prevalence of 20-70 per 100,000 persons and mainly affects young women of childbearing age. The survival

rate over 10 years is approximately 90% (5-year survival rate: >90%; 15 to 20-year survival rate: ca. 80%). Active lupus is commonly treated with the glucocorticoid prednisone, sustained usage of which carries notable risk of serious complications, both immunological and non-immunological, due to its broad effects. Inhibitory receptors could offer a better targeted and more efficient therapeutic approach to halt disease. For instance, neutrophils are thought to be instrumental to the pathogenic loop that underpins the disease by the formation of DNA-based neutrophil extracellular traps (NETs), which activate plasmacytoid dendritic cells. We found that [REDACTED]

[REDACTED] Other immune cell types thought to be crucial to disease pathogenesis, such as B cells and plasmacytoid dendritic cells, could also be targeted via other inhibitory receptors. To obtain proof-of-concept for the treatment of lupus by targeting inhibitory receptors, we will administer newly developed inhibitory receptor agonist to mice with tetramethylpentadecane (TMPD, or pristane)-induced lupus, which show key features of human disease including anti-double stranded DNA autoantibody production, an interferon signature, and immune complex deposition-induced nephritis (Reeves *et al.*, Trends Immunol, 2009).

Asthma is a serious chronic pulmonary inflammatory disease. During an asthma attack, unwarranted exaggerated inflammation causes the airways to narrow resulting in reduced airflow. Asthma is one of the most common chronic diseases world-wide. In Western Europe, asthma prevalence has doubled over the last ten years. Global mortality rates are estimated at 180,000 deaths per year. However, mortality due to asthma is not comparable in size to the day-to-day effects of the disease. Asthma imposes a severe burden on patients and society. The economic costs associated with asthma exceed those of tuberculosis and HIV/AIDS combined. The inception of asthma occurs in a susceptible child upon exposure to environmental triggers, typically respiratory viral infections and sensitization to aero-allergens, such as house dust mite. We propose to establish a novel experimental mouse model for the inception of asthma by house dust mite and respiratory syncytial virus exposure of mice genetically susceptible to asthma. [REDACTED]

[REDACTED] Once established, we may use this model to assess whether treatment with inhibitory immune receptor agonists could reduce symptoms or prevent the inception of asthma. Severe respiratory syncytial virus-induced bronchiolitis is a relevant environmental trigger for asthma inception and reducing the exaggerated pulmonary inflammatory response during infection by targeting inhibitory receptor could prevent subsequent asthma inception (Geerdink *et al.*, J [REDACTED]). This would provide proof-of-concept for novel treatment and prevention strategies of asthma.

Current immune suppressive medication lacks specificity and fails to restrain potently damaging cells, such as neutrophils. Inhibitory immune receptors hold great promise as a novel treatment strategy to more specifically dampen injurious immune responses. In this project, we aim to provide proof-of-concept for the development of inhibitory immune receptor-based therapies to treat immune-mediated diseases.

3.4 Research strategy

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

In this project, we will make combined use of human material, from healthy controls and patients, and complementary animal models. Specific cellular functions related to inhibitory immune receptors will be studied using human cells. This will increase our knowledge on the specific functions of different inhibitory immune receptors in various immune cells. We will initially examine inhibitory receptor expression patterns on immune cells obtained from patients and compare this to healthy controls and/or other compartments in the patients. Subsequently, we will test the potential of expressed inhibitory receptors on relevant immune cells to suppress damaging effector mechanisms.

For example, in RSV bronchiolitis patients, excessive neutrophilic inflammation contributes to lung injury ([REDACTED]). Hence, we set out to identify inhibitory receptors that were expressed on airway-infiltrated neutrophils, which could be used to suppress damaging

inflammation (currently, no effective therapy is available to reduce neutrophilic inflammation). We found that [REDACTED]

Based on *in vitro* investigations such as these, we will select the most promising inhibitory immune receptors for further testing in animal models. Using mice deficient for (or, alternatively, treated with antagonist against) the inhibitory immune receptor of interest, or mice transgenetically altered to express human inhibitory immune receptors, we will be able to study the underlying biology of the receptor. *Ex vivo* analyses will pinpoint phenotypic and functional differences. By challenging the mice with respiratory viral infection, asthma-inducing stimuli, or by inducing autoimmunity a role for the receptor in preventing immune pathology can be assessed. Newly developed agonists for inhibitory receptors proven to limit immune-mediated injury will then be tested in these animal models to study their potential as therapeutic targets. Initially, these agonists will be tested for their potency to stimulate the targeted inhibitory receptor using *in vitro* reporter assays. Additionally, unwanted side effects of the inhibitory receptor agonists, such as immune cell depletion, will be assessed *in vivo* prior to administration of the agonists to mice during the disease models. **The inhibitory receptor agonists will be developed in collaboration with the in house antibody facility of the UMC Utrecht, i.e. U Mab, which has the required ethical approval for the use of animals to generate new antibody clones.**

The biological role of a particular inhibitory immune receptor may vary in different diseases, due to cell-specific expression patterns of inhibitory receptors and the varying roles of immune cells in different diseases, as well as the different modes of inhibition by various inhibitory receptors, among other reasons. Therefore, we will examine multiple inhibitory receptors in several relevant immune-mediated mouse disease models, namely viral respiratory infection, house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma, and systemic lupus erythematosus.

While the course of disease of viral respiratory infections, by viruses such as respiratory syncytial virus and influenza virus, are not identical in mice and (wo)men, clinically relevant parameters such as cellular influx into the lungs, cytokine production, and lung pathology can still be assessed (Bern *et al.*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011; Thangavel *et al.*, *J Immunol Methods*, 2014). Despite limitations, proof-of-concept for reduction of immune-mediated pathology can still be obtained. Previous studies in our group demonstrate that the limiting effect of an inhibitory receptor ([REDACTED]) on pathology, pulmonary cell influx, and cytokine production during respiratory viral infection (influenza) can be successfully determined ([REDACTED]).

The tetramethylpentadecane (TMPD)-induced lupus mouse model closely mimics human disease, including key features such as anti-double stranded DNA autoantibody production, an interferon signature, and immune complex deposition-induced nephritis (Reeves *et al.*, *Trends Immunol*, 2009). This makes it a relevant model to study the role and therapeutic potential of inhibitory immune receptors in systemic lupus erythematosus.

We will establish a novel house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma model using genetically susceptible mice. The inception of asthma occurs in a genetically susceptible child upon exposure to environmental triggers, typically respiratory viral infections and sensitization to aero-allergens, such as house dust mite. [REDACTED] was recently identified as a human asthma and bronchial hyperresponsiveness susceptibility gene and we will use [REDACTED]-deficient mice as a model of the genetically susceptible host [REDACTED]. Both house

dust mite aero-allergens and respiratory syncytial virus are involved in human asthma inception (Calderón *et al.*, J Allergy Clin Immunol, 2015; Geerdink *et al.*, J Allergy Clin Immunol, 2015). Clinical parameters, such as airway hyperresponsiveness, lung compliance, and eosinophilic airway inflammation will be measured. This will result in a relevant mouse model of asthma inception with clinically significant read-outs. In this model, the role of inhibitory receptors and their potential as therapeutic targets can be studied.

Currently, our studies focus mainly on four inhibitory receptors, [REDACTED]. During this project, our investigative efforts, including mouse models, are expected to focus on these inhibitory receptors. However, we routinely screen patient material for expression (and function) of these and additional inhibitory receptors, [REDACTED]. The possibility remains that we will unearth an inhibitory receptor with a promising expression profile and inhibitory capacity on immune cells of relevance to the disease under investigation. In which case, we could expand our studies to include further detailed investigation of this promising inhibitory immune receptor. The main aim of this project is, after all, to obtain proof of concept for inhibitory immune receptors as therapeutic targets in immune-mediated diseases.

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.

Inhibitory immune receptor biology

The role of inhibitory immune receptors in immune-mediated diseases will be examined using genetically modified mice that lack the receptor of interest. These mice and their wild-type counterparts will be challenged with viral respiratory infection, systemic lupus erythematosus, or house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma. If an inhibitory receptor plays a role in suppressing disease, then mice that lack this receptor should show exacerbated disease compared to wild-type mice. As an alternative to genetic ablation of an inhibitory receptor, mice may be treated with a receptor antagonist.

Specific effects (phenotypical and functional) of the genetic ablation will be assessed *ex vivo* with cells obtained from unchallenged mice. Several relevant immune-mediated mouse disease models will be studied, namely viral respiratory infection, house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma, and systemic lupus erythematosus. To obtain additional mechanistic data on the role of inhibitory receptors in lung inflammatory disease, we will induce controlled sterile pulmonary inflammation by intranasal administration of inflammatory agents. [REDACTED]

[REDACTED] Thus it is unclear whether the increased neutrophil migration is a neutrophil-intrinsic effect or induced via other immune cells that may produce more neutrophil-attracting chemokines. By intranasally instilling equal amounts of neutrophil-specific chemokine (e.g. KC/CXCL-1) in wild-type and knock-out mice we may learn whether [REDACTED] on neutrophils itself regulates neutrophil migration and whether possible additional lung pathology is due (in part) to released inhibition of the neutrophils. Such mechanism-oriented studies will only be performed when effects are observed in relevant disease models that would benefit from further detailed explanation.

Inhibitory immune receptor agonist generation

Agonistic antibodies against inhibitory receptors of interest will be generated in collaboration with the in-house antibody facility (UMab, UMC Utrecht). Following *in vitro* assessment of agonistic potential, agonistic antibodies will be characterized *in vivo* in unchallenged wild-type mice. Agonistic antibody-treated mice will be examined for unwanted effects such as immune cell depletion. Vetted antibodies will be used in experiments to obtain proof-of-concept for stimulatory inhibitory immune receptor therapy.

Therapeutic potential of inhibitory immune receptors

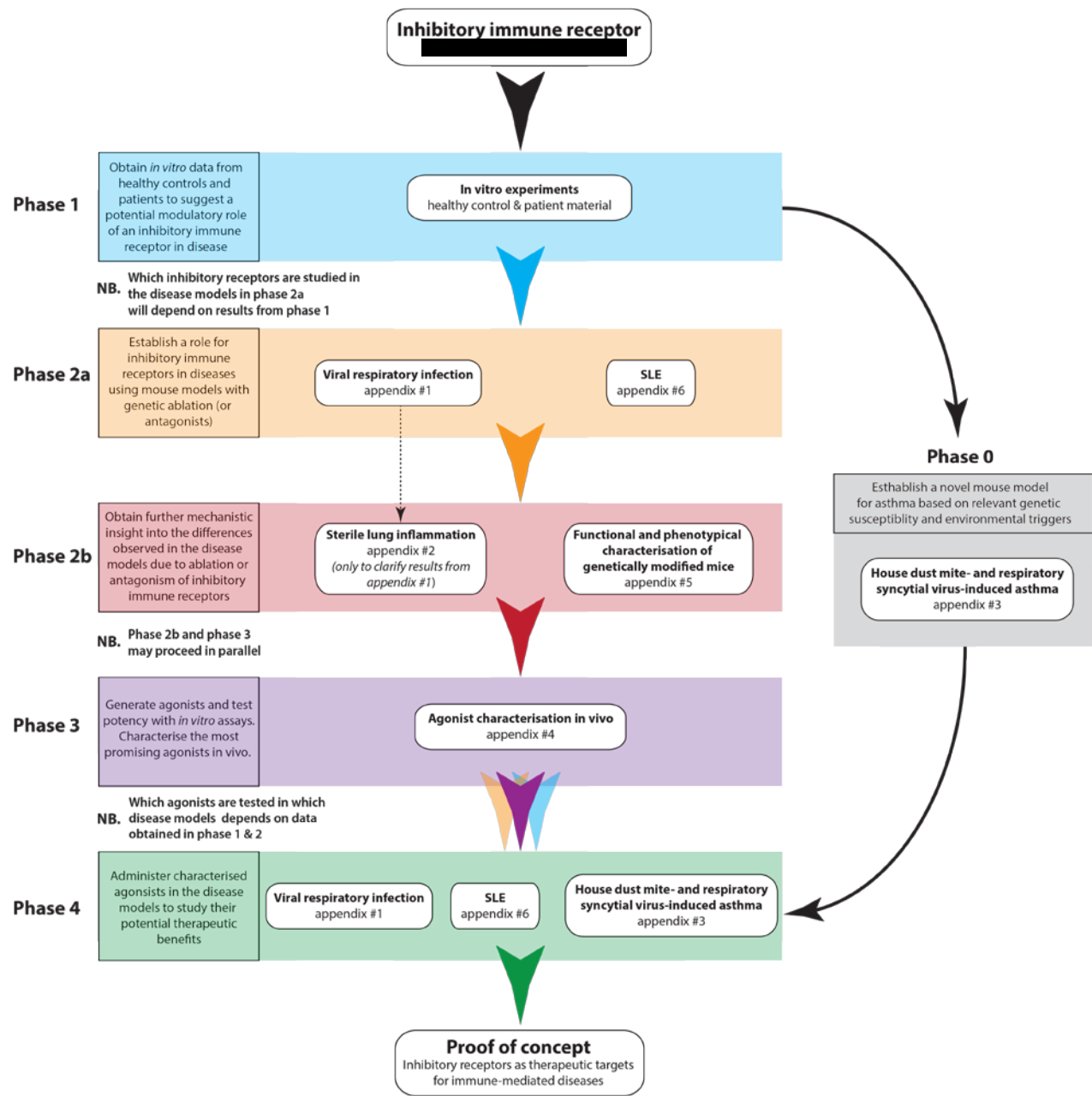
Wild-type mice will be challenged according to one of the disease models and will receive agonists for inhibitory immune receptors to examine whether

disease severity is ameliorated, disease inception can be prevented, or disease progression is halted. Agonists for specific inhibitory receptors will be tested in those disease models for which an worsening of disease was observed when that particular receptor was genetically ablated.

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.

Initially, we will study the expression and function of inhibitory immune receptors on immune cells derived from healthy controls and patients. In this setting, we can determine which inhibitory receptors can modulate immune cells thought to be important to the pathogenesis of several immune-mediated diseases, namely respiratory viral infections (appendix #1), asthma (appendix #3), and systemic lupus erythematosus (appendix #6). The biological role of the inhibitory receptors shown to modulate immune cells important to pathogenesis will then be examined using mice deficient for (or, if available, treated with antagonist against) the inhibitory receptor of interest in the corresponding disease model (appendix #1, #3, #6). Specific effects (phenotypical and functional) of the genetic ablation will be assessed *ex vivo* with cells obtained from unchallenged wild-type and genetically modified mice (appendix #5). For further mechanistic insight into the role of inhibitory receptors in lung inflammatory disease, once demonstrated that the inhibitory receptor affects disease, we will induce controlled sterile pulmonary inflammation by intranasal administration of inflammatory agents to wild-type and genetically modified mice (appendix #2). For inhibitory receptors that were shown to limit disease in the mouse models we will (in collaboration) develop agonists and their potency will be assessed *in vitro*. The most promising agonists will be characterized in wild-type mice and screened for unwanted side effects, such as immune cell depletion (appendix #4). Fully vetted agonists will be administered to wild-type mice in the appropriate disease models (i.e. the model for which the inhibitory immune receptor targeted by the agonist was shown to play a limiting role in disease severity/development) and the effects on disease severity/development will be studied (appendix #1, #3, #6). The effects of various inhibitory immune receptors, [REDACTED] will be examined in the different disease models, i.e. respiratory viral infections (appendix #1), asthma (appendix #3), and systemic lupus erythematosus (appendix #6), in parallel. Together, this will provide proof-of-concept for inhibitory immune receptors as therapeutic targets in immune-mediated diseases.

An schematic overview of the different components of the project can be found below. **The scheme illustrates that the overarching aim common to all disease models is the amelioration of disease by treatment with inhibitory receptor agonists; and, in this way, to obtain proof of concept for inhibitory receptor agonists as therapeutic targets for immune-mediated diseases.**



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	Respiratory viral infections
2	Non-infectious pulmonary inflammation
3	House dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma
4	Characterisation and testing of inhibitory immune receptor agonists
5	Functional and phenotypical characterisation of genetically modified mice
6	Induced auto-immune diseases
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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Respiratory viral infections

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.

Mice, wild type and genetically modified, will be inoculated intranasally with respiratory virus, such as respiratory syncytial virus (RSV), influenza virus, or pneumonia virus of mice (PVM). Beforehand and/or during the infection mice may receive an agonist or antagonist of an inhibitory receptor of interest administered either intravenously, intraperitoneally, or nebulised. Novel inhibitory immune receptor agonists/antagonists will be generated in-house by UMaB, the antibody production facility of the UMC Utrecht. Primary outcome parameters are: (i) clinical disease score, including weight (loss); (ii) lung function; (iii)

leukocyte infiltrate in bronchoalveolar lavage of whole lungs or histopathological and flow cytometric analysis of lung tissue; (iv) viral loads in the lungs. Inflammatory mediators may also be measured in the lung lavage fluid and blood obtained by cardiac puncture post-mortem. Viral replication can be studied using bioluminescence of luciferase-producing virus (Rameix-Welti *et al.*, Nat Commun, 2014; Karnam *et al.*, PLoS Pathog, 2012). Furthermore, macroscopic, microscopic and flow cytometric analysis of other (immunological) organs, including lymph nodes, spleen, and bone marrow, will be performed.

The chosen parameters will allow us to assess the immune- and/or virus-induced lung pathology and the impact thereon of the inhibitory receptor of interest. For respiratory infection of mice, intranasal administration of virus is the preferred method.

An illness grading scale will be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive; mild to moderate dyspnea

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt; moderate to severe dyspnea

5: dead

Illness scores and body weight will be evaluated by a blinded observer. Scores of 4 are not expected to be reached and are considered a humane endpoint. If mice suffer from severe dyspnea (shortness of breath, laboured breathing) leading to excessive discomfort, this is also set as a humane end point.

Experimental groups

Comparisons between wild-type and genetically modified mice will include at least 4 groups:

1. mock-infected wild-type mice
2. mock-infected genetically modified mice
3. virus-infected wild-type mice
4. virus-infected genetically modified mice

NB. Mock-infected mice will be intranasally instilled with the same amount of sterile liquid also used to suspend the virus for inoculation, (e.g. phosphate-buffered saline with 10% [m/v] sucrose).

This set-up may be expanded to examine multiple doses of virus.

To study the effect of inhibitory receptor antagonism, at least the following groups will be included:

1. mock-infected wild-type mice treated with control
2. mock-infected wild-type mice treated with antagonist
3. virus-infected wild-type mice treated with control
4. virus-infected wild-type mice treated with antagonist

NB. In case of an antagonistic antibody the treatment control will be an isotype-matched control antibody; if, for instance, it is a competitively binding soluble version of the inhibitory receptor (in order to block access of the endogenous inhibitory receptor to its ligand), a control protein will be used.

The basic set-up for an experiment to study the effect of agonists of inhibitory receptors on disease severity will include the following groups:

1. mock-infected wild-type mice treated with control
2. mock-infected wild-type mice treated with agonist
3. virus-infected wild-type mice treated with control
4. virus-infected wild-type mice treated with agonist

NB. In case of an agonistic antibody the treatment control will be an isotype-matched control antibody.

This basic set-up could be expanded to include for instance different agonist/control doses, as well as varying frequencies and time points of agonist/control administration depending on the results from pilot experiments. Optimal conditions may vary for different inhibitory receptors and viruses. In such cases, treatment controls and mock infection controls will be taken along for the additional conditions.

Relevance

Viral respiratory infections of mice with, among others, respiratory syncytial virus and influenza virus are well-established models with which we have extensive previous experience ([REDACTED]

[REDACTED] . While the course of disease of viral respiratory infections, by viruses such as respiratory syncytial virus and influenza virus, are not identical in mice and (wo)men, relevant parameters such as cellular influx into the lungs, cytokine production, and lung pathology can still be assessed (Bern *et al.*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011; Thangavel *et al.*, J Immunol Methods, 2014). Despite limitations, proof-of-concept for reduction of immune-mediated pathology can still be obtained. Previous studies in our group demonstrate that the limiting effect of an inhibitory receptor ([REDACTED]) on pathology, pulmonary cell influx, and cytokine production during respiratory viral infection (influenza) can be successfully determined [REDACTED]

Relation to other experiments

For inhibitory receptors that were shown to limit disease severity during viral respiratory infection, (i.e. exacerbated disease in genetic knockout or antagonist treated mice), we will develop agonists and their potency will be assessed *in vitro*. The most promising agonists will be characterized in wild-type mice and screened for unwanted side effects, such as immune cell depletion (appendix #4). Fully vetted agonists will then be tested for amelioration of disease severity during respiratory viral infection as stipulated here. Specific effects (phenotypical and functional) of the genetic ablation will be assessed *ex vivo* with cells obtained from unchallenged wild-type and genetically modified mice (appendix #5). For further mechanistic insight into the role of inhibitory receptors in lung inflammatory disease, once demonstrated that the inhibitory receptor affects disease severity during respiratory viral infection, we will induce controlled sterile pulmonary inflammation by intranasal administration of inflammatory agents to wild-type and genetically modified mice (appendix #2). Investigation of inhibitory immune receptors in other mouse disease models, i.e. house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma (appendix #3), and systemic lupus erythematosus (appendix #6) will be studied in parallel. Prior to performing animal experiments, we will study the expression and function of inhibitory immune receptors on immune cells derived from healthy controls and patients. In this setting, we can determine which inhibitory receptors can modulate immune cells thought to be important to the pathogenesis of several immune-mediated diseases. Only inhibitory receptors thus shown to potentially limit disease will be tested *in vivo*.

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

Viral infection

Nature:

Intranasal infection with respiratory virus of mice will be performed by forced inhalation of approximately 50 µl PBS with viral inoculum under light isoflurane anaesthesia.

Frequency:

Single application or multiple interspersed application

Duration:

Inoculation with respiratory virus takes several minutes.

Mice will be terminated at several time points following inoculation to examine different aspects of the immune response. For instance, in the case of RSV infection, mice will be sacrificed 2 days after inoculation to study the innate immune response, and after 5 days to study the initial adaptive immune response. Experiments will last up to a maximum of 21 days, in order to, for instance, assess the development of cytotoxic T cell responses post-infection. At this point, mice will already have recovered from infection and will no longer suffer from infection-induced discomfort.

All measurements of outcome parameters, with the exception of weight loss, clinical scores, and lung function measurements, are performed post-mortem. Mice will be euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital.

Administration of agonist or antagonist

Nature:

Intraperitoneal, intravenous, or nebulised administration of inhibitory immune receptor agonist or antagonist. The exact doses are to be determined in future pilot experiments.

Frequency:

Variable. Frequency and time point(s) of agonist/antagonist administration are to be determined in future pilot experiments.

Bioluminescence

Mice will be anaesthetized with isoflurane and subsequently injected with 100 µl of luciferin dissolved in phosphate-buffered saline (25 mg/kg).

Bioluminescent signals of anaesthetized mice are collected over a ca. 10 min interval. This only applies to mice specifically infected with luciferase-expressing virus.

Airway responsiveness in anaesthetized mice

Mice are intraperitoneally anaesthetized with ketamine 125 mg/kg and medetomidine 0.2 mg/kg. The animals are ventilated (O₂/air (1:2)) at a frequency of 150 beats/min. The mice are prepared for the measurement of the following lung parameters: pulmonary resistance (RL) and tidal volume (TV). Increasing doses of methacholine (acetyl-β-methyl-choline chloride) are administered by aerosol generated in a nebulizer. After the first dose of methacholine, pulmonary resistance (RL) dynamic compliance (C_{dyn}) and tidal volume (TV) are measured for 3 min, and this procedure is repeated for all doses.

Invasive Right Ventricular Pressure Measurements

Open-chest right ventricular (RV) catheterization is performed before measuring lung function under general anesthesia. Under anesthesia, animals are intubated with a 19-gauge cannula into the trachea. Mice are attached to a mechanical microventilator, ensuring a breathing frequency of 150 breaths/min, inspiratory/expiratory ratio, 1:1, gas flow 1:1 O₂/air mix. Right ventricular systolic pressure (RVSP), diastolic pressure (RVDP) and mean right ventricular pressure (RVMP) are recorded. Analyses are performed when steady state is reached over an interval of at least 3 minutes and averaged.

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

Power calculations based on previous experience with viral respiratory infection models indicate that a group size of 8 mice per group is sufficient to detect biologically relevant and statistically significant differences between wild-type and genetically modified mice [REDACTED].

[REDACTED]. A similar group size has proven to be sufficient to detect differences between control and LAIR-1 antagonist-treated mice (unpublished data). We expect that a group size in a similar range will prove sufficient to detect differences from agonist treatment, but will definitively determine group size based on future pilot experiments. Notably, since mock-infected, control-treated mice show little variance within their experimental group, a group size of 4 has been sufficient in the past and will thus be used.

B. The animals

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

Mice (*Mus musculus*) will be used as experimental animal. Respiratory infections in mice by, for instance, RSV and influenza virus are well-established disease models. While the course of disease of viral respiratory infections, by viruses such as respiratory syncytial virus and influenza virus, are not identical in mice and (wo)men, clinically relevant parameters such as cellular influx into the lungs, cytokine production, and lung pathology can still be assessed (Bern *et al.*, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2011; Thangavel *et al.*, *J Immunol Methods*, 2014). Despite limitations, proof-of-concept for reduction of immune-mediated pathology can still be obtained. Previous studies in our group demonstrate that the limiting effect of an inhibitory receptor [REDACTED] on pathology, pulmonary cell influx, and cytokine production during respiratory viral infection (influenza) can be successfully determined [REDACTED]. Many essential research tools, including genetic modifications and antibodies, are only available in the mouse system. The mice used in the proposed experiments, both wild-type and genetically modified strains, will be housed and bred at the common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University. Mice used in the experiments will be approximately 8 weeks of age, which conforms to previous experiments performed in our group and other published literature.

In general, we will only use female mice. The female immune response is stronger than that of males and we have shown that [REDACTED]. Our research interest lies in preventing immune-mediated pathology. To this end, female mice are a more sensitive model.

In the five-year period of the project, we intend to study multiple inhibitory immune receptors, [REDACTED] in the context of several viral respiratory infections, such as respiratory syncytial virus and influenza virus. Depending on the efficiency by which potent agonists to inhibitory receptors are generated, various agonists may also be tested. Experiments will be repeated twice (n=3) to ensure reproducibility of results. Additionally, a number of pilot experiments will be required to determine optimal dosage, frequency, and timing of agonist delivery.

We also reserve a limited number of mice for training purposes and validation of new virus batches. Only (new) group members who will be involved in our research for more than one year will be eligible for training in intranasal inoculation, bronchoalveolar lavage, and other techniques related to viral respiratory infection. In our experience, there is variation between virus batches and new batches should first be validated, preferably in a direct comparison with a previous batch. Estimated numbers needed: 30 mice/year. For this estimate, we take into account that at least 4 mice need to be used per tested batch (old and new) and the average size of newly made batches of virus (issues of practicality in virus culture prohibit the generation of significantly larger batches). On occasion, a virus batch does not evoke a proper response *in vivo*, in which case a new batch needs to be made and tested again with new (immune naïve) mice.

Estimated total number of mice needed in the 5-year period: 1500 mice. This estimate is based on factors discussed in more detail above.

Experiments with KO (or antagonist-treated) mice (proposal Phase 2a):

Mice per experiment: 24 (e.g. 4x mock WT, 4x mock KO, 8x virus WT, 8x virus KO)

Estimated number of inhibitory receptors tested: 4

Estimated number of viruses tested: 2

Reproducibility of results: n = 3

Total needed: $24 \times 4 \times 2 \times 3 = 576$ mice

Experiments with agonist treated mice (proposal Phase 4):

Mice per experiment: 24 (e.g. 4x mock & control WT, 4x mock & agonist WT, 8x virus & control WT, 8x virus & agonist WT)

Estimated number of inhibitory receptor agonists tested: 4

Estimated number of viruses tested: 2

Reproducibility of results: n = 3

Total needed: $24 \times 4 \times 2 \times 3 = 576$ mice

Testing of virus batches and technique training (training is only for new members that join the research group from more than one year):

Mice per experiment: 10 (e.g. for virus batch testing: 2x mock infected, 4x old batch, 4x new batch)

Estimated frequency: 3x per year

Total needed: $10 \times 3 \times 5 = 150$ mice

Pilot experiments (e.g. agonist administration during disease model at different intervals or with different doses):

Mice per experiment: 10

Estimated number of inhibitory receptors tested: 4

Estimated number of viruses tested: 2

Different conditions tested: 3 (e.g. timing, dosing, administration route)

Total needed: 240 mice

The estimated grand total number of mice needed is therefore ($576 + 576 + 150 + 240 = 1540$) approximately 1500 mice.

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:

Immune responses to respiratory viral infections are highly complex and multifaceted. Interactions between multiple compartments such as bone marrow, circulation, lymphatic system, secondary lymphoid organs, and lungs are involved. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the immune response it elicits *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use

of experimental agonist of inhibitory receptors to test their potential beneficial impact on the course of disease during viral infection can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to infections in mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice. Specifically, the expression and capacity of a particular inhibitory receptor to inhibit immune cells that are important to immune-mediated pathology can be tested using human healthy control and patient material. Only receptors that, based on these results, could potentially impact disease severity will be tested *in vivo* for their role in respiratory viral infection. Whether the expression pattern and functional capabilities of the inhibitory receptor are similar in steady-state mice can be assessed using unchallenged mice (as described in appendix #5).

Reduction:

To minimise the number of surplus mice and ensure the highest degree of comparability between wild-type and genetically modified mice, the modified mouse strains will be maintained as heterozygotes. This way, separately maintaining genetically modified and matched wild-type strains is not necessary. This is intended for maintaining the mouse strains, not for breeding mice for experiments. On the eve of experiments, when large numbers of homozygous mice (both genetically modified and wild type) are required, we will temporarily breed mice from homozygous parents to prevent that many heterozygous mice are lost as surplus. Differences due to genetic drift between wild-type and genetically modified mice will be kept to a minimum in this way. This ensures that experimental differences observed between the wild-type and genetically modified mice are due to the intended genetic modification.

For our experiments we generally employ only female mice, since we have shown there are significant differences between the two sexes in antiviral immune responses. The female immune response is stronger than that of males and we have shown [REDACTED]. Our research interest lies in preventing immune-mediated pathology. To this end, female mice are a more sensitive model [REDACTED]. However, where possible we provide our male mice to collaborators, as we have done in the past, to prevent unnecessary losses.

Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group.

Refinement:

Mice will be housed in groups in cages with nesting opportunities. Virus-inoculated mice will be assessed at least once per day, more if necessary, for clinical signs of infection, including weight loss. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

Mice suffering from unexpectedly severe discomfort will be euthanized, this includes a clinical illness score of 4 and/or severe shortness-of-breath.

During inoculation with virus, mice will be anaesthetised with isoflurane. No pain medication will be administered during the course of infection, since this could interfere with immune regulation, as we have shown for opioids [REDACTED] but also analgesic nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with immune signaling, e.g. via inhibition of cyclooxygenase enzymes that produce inflammatory lipid mediators. Moreover, discomfort experienced by experimental animals is likely to depend more on other factors such as shortness of breath or fever rather than pain. During invasive lung and heart function measurements, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine.

There are no expected adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

During inoculation with virus, mice will be anaesthetised with isoflurane. No pain medication will be administered during the course of infection, since this could interfere with immune regulation, as we have shown for opioids [REDACTED] but also analgesic nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with immune signaling, e.g. via inhibition of cyclooxygenase enzymes that produce inflammatory lipid mediators. Moreover, discomfort experienced by experimental animals is likely to depend more on other factors such as shortness of breath or fever rather than pain. During invasive lung and heart function measurements, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine.

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?

As a direct result of viral infection, mice may experience discomfort in the form of shortness of breath and fever. Where applicable, handling of mice for bioluminescent imaging can result in transient mild discomfort. Where applicable, the administration of agonist/antagonist can result in transient mild discomfort, resulting e.g. from intraperitoneal injection. While invasive lung and heart function tests would result in severe discomfort, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine during measurements and euthanized at completion.

Explain why these effects may emerge.

Viral respiratory infection induces discomfort due to pathological effects of the virus and immune response. The handling of mice, e.g. injecting agonist/antagonist or measuring bioluminescence, is necessary to test experimental parameters.

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

This discomfort is inherent to the model of viral respiratory infection and cannot be treated without compromising the model.

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.

Weight loss exceeding 20% of original weight, reaching a score of 4 on the illness scale (specified above), and severe shortness of breath is set as the humane end point.

Indicate the likely incidence.

Severity of disease depends on the dose of the viral inoculum. The dose will be chosen to avoid that mice reach the humane end point. However, we have previously shown that mice in which inhibitory receptors are genetically ablated present with more severe viral disease (Karnam *et al.*, PLoS Pathog, 2012). For initial experiments with previously untested mouse strains it is therefore difficult to predict the proportion of mice that will reach the humane end point. Pilot experiments will be employed to determine the appropriate dose for new mouse strains.

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').

Cumulative levels of discomfort are expected to be moderate.

Pilot studies for (genetically modified) mouse strains not yet tested for infection with a particular respiratory virus will be undertaken to prevent occurrence of unexpectedly severe discomfort in subsequent experiments.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

In order to obtain a whole lung lavage or lung tissue for histopathological analysis the mice must first be killed, since the mice would not survive either of these procedures. Neither are invasive measurements of lung and heart function compatible with continued survival of the test subject

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

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

X Yes



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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Non-infectious pulmonary 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.

Mice, wild type and genetically modified, will receive intranasal or nebulised/gaseous administration of sterile inflammatory agent(s), such as CXCL-1 (KC) or C5a (Trujillo *et al.*, J Immunol, 2013), to induce non-infectious pulmonary inflammation. This will allow us to more specifically (compared to viral respiratory infection) delineate the effects of inhibitory receptors during inflammation, e.g. increased immune cell recruitment in response to identical dose of inflammatory agent. Additionally, inhibitory immune receptor agonists or antagonists may be administered to wild-type mice. Agonists will be studied for the

mechanistic effects underlying their therapeutic potential (e.g. specifically inhibiting cell recruitment and/or function), whereas antagonists can be used to mimic genetic ablation of a receptor should a knock-out mice not be available (on an appropriate genetic background). Primary outcome parameters are: leukocyte infiltrate in bronchoalveolar lavage of whole lungs or histopathological and flow cytometric analysis of lung tissue. Inflammatory mediators may also be measured in the lung lavage fluid and blood obtained by cardiac puncture post-mortem. Furthermore, macroscopic, microscopic and flow cytometric analysis of other (immunological) organs, including lymph nodes, spleen, and bone marrow, will be performed.

Experimental groups

Comparisons between wild-type and genetically modified mice will include at least 4 groups:

1. mock-instilled wild-type mice
2. mock-instilled genetically modified mice
3. inflammatory mediator-instilled wild-type mice
4. inflammatory mediator-instilled genetically modified mice

NB. Mock-instilled mice will be intranasally instilled with the same amount of sterile liquid also used to suspend the virus for inoculation, (e.g. phosphate-buffered saline).

This set-up may be expanded to examine multiple doses of inflammatory agent.

The basic set-up for an experiment to study the effect of agonists of inhibitory receptors on pulmonary inflammation will include the following groups:

1. mock-instilled wild-type mice treated with control
2. mock-instilled wild-type mice treated with agonist
3. inflammatory mediator-instilled wild-type mice treated with control
4. inflammatory mediator-instilled wild-type mice treated with agonist

NB. In case of an agonistic antibody the treatment control will be an isotype-matched control antibody.

Relation to other experiments

Initially, we will study the expression and function of inhibitory immune receptors on immune cells derived from healthy controls and patients suffering from respiratory viral infection. Based hereupon, we will select inhibitory receptors to study in animal models of respiratory viral infections. If an inhibitory receptor limits pathology, we expect to see increased disease severity in mice deficient for this inhibitory receptor (appendix #1). To obtain additional mechanistic data on the role of inhibitory receptors in lung inflammatory disease, we will induce controlled sterile pulmonary inflammation by intranasal administration of inflammatory agents.

Thus it is unclear whether the increased neutrophil migration is a neutrophil-intrinsic effect or induced via other immune cells that may produce more neutrophil-attracting chemokines. By intranasally instilling equal amounts of neutrophil-specific chemokine (e.g. KC/CXCL-1) in wild-type and knock-out mice we may learn whether on neutrophils itself regulates neutrophil migration and whether possible additional lung pathology is due (in part) to released inhibition of the neutrophils.

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

Administration inflammatory agent

Nature:

Intranasal administration will be performed by forced inhalation of 50 µl PBS with inflammatory agent under light isoflurane anaesthesia.

Frequency:

Single application

Duration:

Mice will be euthanized at several time points up to 48 h.

Measurements of outcome parameters are performed post-mortem. Mice will be euthanized by interperitoneal injection of pentobarbital.

Administration of agonist or antagonist

Nature:

Intraperitoneal, intravenous, or nebulised administration of inhibitory immune receptor agonist or antagonist. The exact timing and doses are to be determined in future experiments. Agonist/antagonist may be administered prior to or after instilling the inflammatory agent.

Frequency:

To be determined in future pilot experiments.

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

Power calculations based on literature indicate that a group size of 8 mice per group is sufficient to detect biologically relevant and statistically significant differences between wild-type and genetically modified mice (Trujillo *et al.*, J Immunol, 2013). This mirrors our experience with viral respiratory infections with a similar group size [REDACTED]

[REDACTED] We expect that a group size in a similar range will prove sufficient to detect differences from agonist treatment, but will definitively determine group size based on future pilot experiments. Notably, since mock-instilled, control-treated mice show little variance within their experimental group, a group size of 4 will be sufficient.

B. The animals

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

Mice (*Mus musculus*) will be used as experimental animal. This model of sterile lung inflammation is meant to provide additional mechanistic insight into the respiratory viral infection model (appendix #1). Respiratory infections in mice by, for instance, RSV and influenza virus are well-established disease models. While the course of disease of viral respiratory infections, by viruses such as respiratory syncytial virus and influenza virus, are not identical in mice and (wo)men, clinically relevant parameters such as cellular influx into the lungs, cytokine production, and lung pathology can still be assessed (Bern *et al.*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011; Thangavel *et al.*, J Immunol Methods, 2014). Despite limitations, proof-of-concept for reduction of immune-mediated pathology can still be obtained. Previous studies in our group demonstrate that the limiting effect of an inhibitory receptor [REDACTED] on pathology, pulmonary cell influx, and cytokine production during respiratory viral infection (influenza) can be successfully determined [REDACTED]. Additionally, many essential research tools, including genetic modifications and antibodies, are only available in the mouse system. Therefore, in this sterile lung inflammation model we will also use mice. The mice used in the proposed experiments, both wild type and genetically modified strains, will be housed and bred at the common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University. Mice used in the experiments will be approximately 8-12 weeks of age.

In general, we will only use female mice. The female immune response is stronger than that of males and we have shown that [REDACTED]

[REDACTED] Our research interest lies in preventing immune-mediated pathology. To this end, female mice are a more sensitive model. The model of sterile lung inflammation

described here is used to obtain further mechanistic insights into the results obtained in the viral respiratory infection model (appendix #1). In the viral respiratory model, for reasons also described above, only female mice are used. Hence, for the further study of mechanistic aspects, we will also female mice.

In the five-year period of the project, we intend to study multiple inhibitory immune receptors, [REDACTED] Experiments will be repeated twice (n=3) to ensure reproducibility of results. Additionally, a number of pilot experiments will be required to determine optimal dosage, frequency, and timing of agonist delivery.

Experiments with inhibitory receptor KO mice

Mice per experiment: 24 (e.g. 4x mock WT, 4x mock KO, 8x treated WT, 8x treated KO)

Estimated number of inhibitory receptors tested: 4

Reproducibility of results: n = 3

Total needed: $24 \times 4 \times 3 = 288$ mice

Mice per experiment: 24 (e.g. 4x mock & control WT, 4x mock & agonist WT, 8x treated & control WT, 8x treated & agonist WT)

Estimated number of inhibitory receptor agonists tested: 2 (not expected to be needed for each tested inhibitory receptor)

Estimated number of viruses tested: 2

Reproducibility of results: n = 3

Total needed: $24 \times 2 \times 3 = 144$ mice

Pilot experiments (e.g. agonist administration during disease model at different intervals or with different doses):

Mice per experiment: 10

Estimated number of inhibitory receptors tested: 2

Different conditions tested: 3 (e.g. timing, dosing, administration route)

Total needed: 60 mice

The estimated grand total number of mice needed is therefore ($288 + 144 + 60 = 492$) approximately 500 mice.

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:

Pulmonary inflammation is a highly complex and multifaceted process. Interactions between multiple compartments such as bone marrow, circulation, and lungs are involved. Certain aspects of the inflammatory immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study lung inflammation *in vitro*. In this setting we can use of genetically modified animals and experimental agonists/antagonists to assess the role of inhibitory immune receptors in pulmonary inflammation. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture all aspects of inflammation. Mechanistic studies described here will only be performed once an effect has been found in a relevant respiratory viral infection model. Before turning to infections in mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice. Specifically, the expression and capacity of a particular inhibitory receptor to inhibit immune cells that are important to immune-mediated pathology can be tested using human healthy control and patient material. Only receptors that, based on these results, could potentially impact disease severity will be tested *in vivo* for their role in respiratory viral infection. Whether the expression pattern and functional capabilities of the inhibitory receptor are similar in steady-state mice can be assessed using unchallenged mice (as described in appendix #5).

Reduction:

To minimise the number of surplus mice and ensure the highest degree of comparability between wild type and genetically modified mice, the modified mouse strains will be maintained as heterozygotes. This way, separately maintaining genetically modified and matched wild-type strains is not necessary. This is intended for maintaining the mouse strains, not for breeding mice for experiments. On the eve of experiments, when large numbers of homozygous mice are required, we will temporarily breed mice from homozygous parents to prevent that many heterozygous mice are lost as surplus. Differences due to genetic drift between wild-type and genetically modified mice will be kept to a minimum in this way. This ensures that experimental differences observed between the wild-type and genetically modified mice are due to the intended genetic modification and not an 'off-target effect.'

For our experiments we generally employ only female mice, since we have shown there are significant differences between the two sexes in antiviral immune responses. The female immune response is stronger than that of males and we have shown that [REDACTED]

[REDACTED] Our research interest lies in preventing immune-mediated pathology. To this end, female mice are a more sensitive model. [REDACTED] However, where possible we provide our male mice to collaborators, as we have done in the past, to prevent unnecessary losses.

Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group.

Refinement:

Mice will be housed in groups in cages with nesting opportunities. Mice will be inspected for discomfort 4 h after administration of inflammatory mediator, the time point at which pulmonary inflammation is expected to reach its peak (Trujillo *et al.*, *J Immunol*, 2013), and inspected again the next day. If unexpectedly severe suffering is observed during the experiment, mice will be euthanized.

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

Mice suffering from unexpectedly severe discomfort will be euthanized.

There are no expected adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

During administration of the inflammatory agent, mice will be anaesthetised with isoflurane. No pain medication will be administered during the course of infection, since this could interfere with immune regulation, as we have shown for opioids [REDACTED] but also analgesic nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with immune signaling, e.g. via inhibition of cyclooxygenase enzymes that produce inflammatory lipid mediators. Moreover, discomfort experienced by experimental animals is likely to depend more on other factors such as shortness of breath or fever rather than pain.

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?

Mice may experience discomfort in the form of shortness of breath.

Where applicable, the administration of agonist/antagonist can result in transient mild discomfort, resulting e.g. from intraperitoneal injection.

Explain why these effects may emerge.

Shortness of breath may be induced by the induced pulmonary inflammation.

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

This discomfort is inherent to the model of pulmonary inflammation and cannot be treated without compromising the model.

J. Humane endpoints

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

X No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

The induced pulmonary inflammation is not expected to be severe enough for mice to reach a humane endpoint. In fact, the dose of the inflammatory agent will be chosen to specifically avoid severe 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').

Cumulative levels of discomfort are expected to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Whole lung lavage or excision of lung tissue for histopathological analysis is not compatible with continued survival of the mice.

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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure House dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma

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.

██████████ is a recently identified asthma and bronchial hyperresponsiveness (BHR) susceptibility gene that is expressed in airway epithelium. Common polymorphisms in the gene encoding ██████████ are associated with increased susceptibility to BHR and asthma ██████████. Preliminary data suggest that ██████████-deficient mice show exacerbated BHR in response to house dust mite allergen exposure and that ██████████-deficient mice are more susceptible to RSV infection, both of which are associated with asthma

development. For these reasons, [REDACTED]-deficient and transgenic mice will be used as model for genetic susceptibility to asthma. To trigger the inception of asthma, mice will be exposed to aeroallergens (from house dust mite) and/or viral respiratory infection (by respiratory syncytial virus). The optimal exposure of these environmental triggers to induce asthma will be determined in initial pilot experiments. Once the asthma inception model has been optimized, inhibitory receptors can be targeted herein to assess their impact on asthma inception and their potential as therapeutic target. Primary outcome parameters are: (i) clinical symptoms; (ii) lung function; (iii) leukocyte infiltrate in bronchoalveolar lavage of whole lungs or histopathological and flow cytometric analysis of lung tissue; (iv) systemic antibody and inflammatory mediator responses. Additionally, viral replication can be assessed by bioluminescence in mice infected with luciferase-expressing virus (Rameix-Welti *et al.*, Nat Commun, 2014); and epithelial gene expression signatures will be examined to study the effect of asthma-inducing stimuli and inhibitory immune receptor stimulation on airway epithelium.

The experimental set-up for the initial experiments to optimize the asthma inception model are described below. An example pilot experiment on the induction of asthma inception by RSV infection will include the following groups:

1. mock-infected wild-type mice
2. mock-infected [REDACTED]-deficient mice
3. respiratory syncytial virus-infected wild-type mice
4. respiratory syncytial virus-infected [REDACTED]-deficient mice

The basic set-up for an experiment to study the effect of agonists of inhibitory receptors on disease severity will include the following groups:

5. mock-exposed [REDACTED]-deficient mice treated with control
6. mock-exposed [REDACTED]-deficient mice treated with agonist
7. virus/allergen-exposed [REDACTED]-deficient mice treated with control
8. virus/allergen-exposed [REDACTED]deficient mice treated with agonist

NB. In case of an agonistic antibody the treatment control will be an isotype-matched control antibody.

This basic set-up could be expanded to include for instance different agonist/control doses, as well as varying frequencies and time points of agonist/control administration depending on the results from pilot experiments. Optimal conditions may vary for different inhibitory receptors. In such cases, treatment controls and mock-exposed controls will be taken along for the additional conditions.

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

Respiratory virus-induced asthma

RSV infection at 8 weeks; & neonatal RSV infection. To characterize the susceptibility of [REDACTED]-deficient mice to clinically relevant parameters of airway inflammation, remodelling and hyperresponsiveness induced by RSV infections, we will infect [REDACTED] knockout mice and wild-type mice with RSV as neonates (7 days old pups) or at age 6-8 weeks with RSV type A2 or UV-inactivated RSV. The UV-inactivated RSV will serve as a control for the immunogenic effect of viral proteins and RNA in the absence of productive infection. This will inform us whether the elicited immune response by inactivated, but still immunogenic virus particles is sufficient, or if productive replication-induced epithelial damage is also required for the induction of hyperresponsiveness.

RSV re-infection. In addition, a group of neonatally infected mice will be re-infected with RSV type A2 at an age of 8 weeks, and the clinical parameters will be monitored daily in a blinded fashion after re-infection. At day 5 after the primary or secondary infection with RSV, a subset of mice will be sacrificed for in-depth histopathological analysis of inflammatory and structural parameters by standardised methods.

An illness grading scale will be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

- 0: healthy
- 1: barely ruffled fur
- 2: ruffled fur, but active
- 3: ruffled fur and inactive; mild to moderate dyspnea
- 4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt; moderate to severe dyspnea
- 5: dead

Illness scores and body weight will be evaluated by a blinded observer. Scores of 4 are not expected to be reached and are considered a humane endpoint. If mice suffer from severe dyspnea (shortness of breath, laboured breathing) leading to excessive discomfort, this is also set as a humane end point.

Also, a sum score for interstitial inflammation, endothelialitis, bronchitis, edema, thrombus, and pleuritis (each scored 0-4) will be calculated. In a separate group of mice, we will measure lung function parameters (compliance and airway resistance) by direct invasive measurements (see below) and evaluate airway inflammation by presence of inflammatory immune cells in lung tissue and broncho-alveolar lavage (BAL) fluid. Moreover, we will assess cytokines in lung tissue, systemic levels of RSV-specific IgG, viral titers in lung, and lung histopathology.

Respiratory virus and aeroallergen-induced asthma

HDM dose study. To determine the minimal HDM dose required for sensitisation, [REDACTED]-deficient mice and wild-type (WT) controls will be exposed to HDM intranasally three times in one week early in life (e.g. the first week of life) at 25, 5, 1 or 0 µg HDM per treatment. Two weeks after the last HDM treatment, mice will be sacrificed and analysed for sensitization.

HDM rechallenge. Next, we will use the minimal dose inducing HDM sensitization in [REDACTED] KO mice as neonates for a second experiment. In this second series of experiments, we will treat [REDACTED]-deficient and wild-type mice for 3 weeks with HDM (3 times per week) followed by 5 HDM or PBS challenges in 1 week at 10 weeks of age. These mice will be used for detailed analysis of lung function, epithelial integrity, pulmonary inflammatory cells, and systemic levels of HDM-specific IgE and IgG.

RSV/HDM challenge. We will perform RSV infections at the first week of age, followed by HDM exposures at weaning (week 3) and test whether the airway epithelial, innate and adaptive immune response to HDM exposure after RSV infection are qualitatively different between [REDACTED]-deficient and control mice in young mice.

HDM/RSV challenge. We will treat newborn mice with HDM for 3 times during the first week of life, followed by RSV infection at weaning (week 3) and ask whether primary RSV-induced responses are qualitatively or quantitatively different in young [REDACTED]-deficient mice that had prior sensitization to HDM.

RSV reinfection. Moreover, we will perform re-infection of the mice at 8 weeks of age and test whether long-term effects of RSV infection are different between [REDACTED]-deficient and wild-type mice that were HDM sensitized at the time of the first RSV infection.

We will select the model that renders the most significant differences between [REDACTED]-deficient and wild-type mice in clinically relevant parameters of allergic asthma (such as AHR, lung compliance, eosinophilic airway inflammation and airway remodeling) as the experimental model for the inception of asthma for use in the remainder of the project. The role of inhibitory receptors will be investigated in this optimised model using genetic modifications and agonists/antagonists of inhibitory receptors.

Epithelial gene expression signature. In addition, we will examine airway epithelial gene expression signatures in neonatal and adult mice. The airway

epithelium is thought to play a crucial role in asthma inception. We will sort airway epithelial cells from mice with induced asthma and controls, both neonatal and adult mice, using flow cytometry. In this manner, we can examine the effect of asthma-inducing stimuli and inhibitory immune receptor stimulation (by agonist treatment) on airway epithelium.

Airway responsiveness in anaesthetized mice

Mice are intraperitoneally anaesthetized with ketamine 125 mg/kg and medetomidine 0.2 mg/kg. The animals are ventilated (O₂/air (1:2)) at a frequency of 150 beats/min. The mice are prepared for the measurement of the following lung parameters: pulmonary resistance (RL) and tidal volume (TV). Increasing doses of methacholine (acetyl- β -methyl-choline chloride) are administered by aerosol generated in a nebulizer. After the first dose of methacholine, pulmonary resistance (RL) dynamic compliance (C_{dyn}) and tidal volume (TV) are measured for 3 min, and this procedure is repeated for all doses.

Bioluminescence

Mice will be anaesthetized with isoflurane and subsequently injected with 100 μ l of luciferin dissolved in phosphate-buffered saline (25 mg/kg). Bioluminescent signals of anaesthetized mice are collected over a ca. 10 min interval. This only applies to mice specifically infected with luciferase-expressing virus.

Inhibitory immune receptor agonists

Intraperitoneal, intravenous, or nebulised administration of inhibitory immune receptor agonist or antagonist will be administered at different time points to assess the effect on the relevant parameters mentioned above. The exact dose and administration method hereof are to be determined in future pilot experiments.

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

Based on estimated variation and the magnitude of biologically significant differences, we expect that an group size of 10 mice is sufficient to detect statistically significant differences. This has proven to be an appropriate group size for other asthma models in literature (Johnson *et al.*, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015). Additionally, a number of pilot experiments will be performed to determine optimal dosage, frequency, and timing of agonist delivery.

For epithelial gene signature studies, experience has shown that more animals per group are needed to obtain enough epithelial cells to perform reliable measurements. For each experimental group 40 mice are needed for 5 pools of 8 mice (i.e. 5 data points per group).

B. The animals

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

Female and male mice (*Mus musculus*) will be used as experimental animals in equal measure. Mice are a well-established research model to study allergic sensitisation. Mouse models of asthma provide insight into the pathogenesis of airway hyperresponsiveness. The induced disease of mice mimics that of humans and clinically relevant parameters (discussed above), such as lung compliance, airway responsiveness, airway inflammation, and airway remodelling, can be assessed in mice (Kumar and Foster, Front Physiol, 2012). Moreover, many essential research tools, including genetic modifications and antibodies, are only available in the mouse system. The mice used in the proposed experiments, both wild-type and genetically modified strains, will be housed and bred at the common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University. Age of the mice depends on the exact experiment, as stipulated above.

█-deficient mice have been generated and will be provided by collaborators. There is no inherent discomfort that results from the genetic ablation of █. Thus, breeding of █ mice is not counted towards the total number of mice used.

In the five-year period of the project, we intend to optimize the house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma inception model. Subsequently, we will study the effect of multiple inhibitory immune receptors, [REDACTED], in the asthma inception model. Depending on the efficiency by which potent agonists to inhibitory receptors are generated, various agonists may also be tested. Experiments will be repeated twice (n=3) to ensure reproducibility of results. Additionally, a number of pilot experiments will be required to determine optimal dosage, frequency, and timing of agonist delivery.

We also reserve a limited number of mice for training purposes and validation of new respiratory syncytial virus batches. Only (new) group members who will be involved in our research for more than one year will be eligible for training in intranasal inoculation, neonatal infections, bronchoalveolar lavage, and other techniques related to the asthma inception model. In our experience, there is variation between respiratory syncytial virus batches and new batches should first be validated, preferably in a direct comparison with a previous batch. Estimated numbers needed: 30 mice/year. For this estimate, we take into account that at least 4 mice need to be used per tested batch (old and new) and the average size of newly made batches of virus (issues of practicality in virus culture prohibit the generation of significantly larger batches). On occasion, a virus batch does not evoke a proper response *in vivo*, in which case a new batch needs to be made and tested again with new (immune naive) mice.

Estimated total number of mice needed in the 5-year period: 1500 mice. This different types of experiment are discussed above (2A, second box). For the optimisation of the HDM- and RSV-induced asthma model, the different experiments will performed once. Agonists treatment of HDM- and RSV-induced asthma and epithelial cell gene signature studies will be performed in triplicate.

HDM- and RSV-induced asthma model optimisation

RSV infection at 8 weeks

Mice per group: 10

Number of groups: 4 (mock WT, mock KO, RSV WT, RSV KO)

Total number of mice: 40

Neonatal RSV infection

Mice per group: 10

Number of groups: 4 (mock WT, mock KO, RSV WT, RSV KO)

Total number of mice: 40

RSV re-infection

Mice per group: 10

Number of groups: 4 (RSV/mock WT, RSV/mock KO, RSV/RSV WT, RSV/RSV KO; all neonatal RSV infection)

Total number of mice: 40

HDM dose study:

Mice per group: 10

Number groups: 8 (WT or KO (=2x); 0, 1, 5 or 25 µg HDM per treatment (=4x); 2x4=8 groups)

Total number of mice: 80

HDM re-challenge study

Mice per group: 10

Number of groups: 4 (HDM/mock WT, HDM/mock KO, HDM/HDM WT, HDM/HDM KO; all neonatal HDM exposure)

Total number of mice: 40

RSV/HDM challenge

Mice per group: 10

Number of groups: 2 (RSV/HDM WT, RSV/HDM KO; NB. RSV/mock WT vs. RSV/mock KO are already compared in "RSV re-infection")

Total number of mice: 20

HDM/RSV challenge

Mice per group: 10

Number of groups: 2 (HDM/RSV WT, HDM/RSV KO; NB. HDM/mock WT vs. HDM/mock KO are already compared in "HDM re-challenge")

Total number of mice: 20

Epithelial gene expression signature

Mice per group: 40

Number of groups: 4 (neonatal vs. adult [=2x]; with/without HDM- & RSV-induced asthma [=2x]; 2x2=4)

Reproducibility of results: n = 3

Total number of mice: 480

Agonist treatment

Mice per group: 10

Number of groups: 4 (mock unchallenged, mock asthma, agonist unchallenged, agonist asthma; all PCDH-1 KO mice)

Number of inhibitory receptors: 4

Reproducibility of results: n = 3

Total number of mice: 480

Pilot experiments (e.g. agonist administration during disease model at different intervals or with different doses):

Mice per experiment: 10

Estimated number of inhibitory receptor agonists tested: 4

Different conditions tested: 3 (e.g. timing, dosing, administration route)

Total needed: 120 mice (approximate)

Testing of virus batches and technique training (training is only for new members that join the research group from more than one year):

Mice per experiment: 10 (e.g. for virus batch testing: 2x mock infected, 4x old batch, 4x new batch)

Estimated frequency: 3x per year

Total needed: 10 x 3 x 5 = 150 mice (approximate)

The estimated grand total number of mice needed is therefore (40 + 40 + 40 + 80 + 40 + 20 + 20 + 480 + 480 + 120 + 150 = 1510) approximately 1500

mice.

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:

Immune responses to respiratory viral infections and allergic sensitisation are highly complex and multifaceted. Interactions between multiple compartments such as bone marrow, circulation, lymphatic system, secondary lymphoid organs, and lungs are involved. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the immune response it elicits *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental agonist of inhibitory receptors to test their potential beneficial impact on the course of disease during viral infection can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to infections in mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice. Specifically, the expression and capacity of a particular inhibitory receptor to inhibit immune cells that are important to immune-mediated pathology can be tested using human healthy control and patient material. Only receptors that, based on these results, could potentially impact disease severity will be tested *in vivo* for their role in asthma inception. Whether the expression pattern and functional capabilities of the inhibitory receptor are similar in steady-state mice can be assessed using unchallenged mice (as described in appendix #5).

Reduction:

To minimise the number of surplus mice and ensure the highest degree of comparability between wild-type and genetically modified mice, the modified mouse strains will be maintained as heterozygotes. This way, separately maintaining genetically modified and matched wild-type strains is not necessary. This is intended for maintaining the mouse strains, not for breeding mice for experiments. On the eve of experiments, when large numbers of homozygous mice (both genetically modified and wild type) are required, we will temporarily breed mice from homozygous parents to prevent that many heterozygous mice are lost as surplus. Differences due to genetic drift between wild-type and genetically modified mice will be kept to a minimum in this way. This ensures that experimental differences observed between the wild-type and genetically modified mice are due to the intended genetic modification.

Statistical power calculation based on our own previous experience, pilot experiments, and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group.

Refinement:

Mice will be housed in groups in cages with nesting opportunities. Virus-inoculated mice will be assessed at least once per day, more if necessary, for clinical signs of infection, including weight loss. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

Mice suffering from unexpectedly severe discomfort will be euthanized.

During inoculation with virus, mice will be anaesthetised with isoflurane. No pain medication will be administered during the course of infection, since this could interfere with immune regulation, as we have shown for opioids (), but also analgesic nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with immune signaling, e.g. via inhibition of cyclooxygenase enzymes that produce inflammatory lipid mediators. Moreover, discomfort experienced by experimental animals is likely to depend more on other factors such as shortness of breath or fever rather than pain. During invasive lung and heart function measurements, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine.

There are no expected adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

During inoculation with virus, mice will be anaesthetised with isoflurane. No pain medication will be administered during the course of infection, since this could interfere with immune regulation, as we have shown for opioids [REDACTED] but also analgesic nonsteroidal anti-inflammatory drugs interfere with immune signaling, e.g. via inhibition of cyclooxygenase enzymes that produce inflammatory lipid mediators. Moreover, discomfort experienced by experimental animals is likely to depend more on other factors such as dyspnea or fever rather than pain. During invasive lung and heart function measurements, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine.

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?

As a direct result of viral infection, mice may experience discomfort in the form of shortness of breath and fever.

Where applicable, the administration of house dust mite, agonist/antagonist, or luciferin (for bioluminescence) can result in transient mild discomfort, resulting e.g. from intranasal instillation or intraperitoneal injection.

Once successfully induced, asthma symptoms such as shortness of breath can result in discomfort of mice.

While invasive lung function tests would result in severe discomfort, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine during measurements and euthanized at completion.

Explain why these effects may emerge.

These are direct effects of viral respiratory infection and asthma.

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

This discomfort is inherent to the model of house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma and cannot be treated without compromising the model.

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.

Reaching a score of 4 on the illness scale and/or severe dyspnea; for adult mice, losing more than 20% of original body weight.

Indicate the likely incidence.

Mice with experimentally induced asthma do not, as a rule, die from disease nor reach a humane endpoint. Only in the case of comorbidity, such as sickle cell disease, do mice show reduced survival (Nandedkar *et al.*, Blood, 2008).

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').

Cumulative levels of discomfort are expected to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Accurate assessment of lung function requires invasive measurements that are not compatible with continued survival of the test subject.

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

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

X Yes



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 |
|---------------|---|
| 4 | Characterisation and testing of inhibitory immune receptor agonists |

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.

In order to study the function and the potential as therapeutic target of inhibitory immune receptors *in vivo*, compounds that can specifically engage these receptors, such as monoclonal antibodies, must be developed. For our project, such monoclonal antibodies will be generated in collaboration with the antibody facility of the UMC Utrecht. Prior to their use in disease models, newly developed compounds should be fully characterized in wild-type mice. Antibodies, for instance, can mediate the (undesired) depletion of cells that express the targeted receptor. Thus, the depleting potential, dissemination, and

pharmacokinetics of novel inhibitory receptor agonists and antagonists administered by multiple routes will be assessed. Following the final administration of agonists, mice may be studied for up to an additional 2 weeks.

Experimental groups

To characterize the *in vivo* effects of the agonists the following groups will be used:

1. Mock-treated wild-type mice
2. Agonist-treated wild-type mice

NB. In case of an agonistic antibody the treatment control will be an isotype-matched control antibody.

This basic set-up can be expanded to include, for instance, comparison of multiple doses, frequencies, and modes of agonist administration.

Relation to other experiments

Prior to performing animal experiments, we will study the expression and function of inhibitory immune receptors on immune cells derived from healthy controls and patients. In this setting, we can determine which inhibitory receptors can modulate immune cells thought to be important to the pathogenesis of several immune-mediated diseases. Only inhibitory receptors thus shown to potentially limit disease will be tested *in vivo*. For inhibitory receptors that were shown to limit disease severity/progression, (i.e. exacerbated disease in genetic knockout or antagonist treated mice), we will develop agonists and their potency will be assessed *in vitro*. Only the most promising/potent *in vitro* agonists will be tested *in vivo*. We will test respiratory viral infection (appendix #1), house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma (appendix 3), and systemic lupus erythematosus. The most potent agonists *in vitro* will be characterized in wild-type mice and screened for unwanted side effects, as described here, before testing therapeutic potential in the disease models, as described here.

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

At multiple time points, mice will receive varying doses of agonist/antagonist by injection, either intraperitoneal or intravenous, or as nebulised compound. Over time, the concentration of the administered agonist/antagonist in blood and other compartments will be analysed to assess pharmacokinetics and dissemination. The differentiated immune cell numbers of multiple compartments will be determined to examine possible depletion effects. Following the final administration of agonists, mice may be studied for up to an additional 2 weeks.

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

Groups will comprise up to 6 mice. These numbers are comparable to those used in experiments in published literature that look at (unintended) antibody-mediated cell depletion (Nishikado *et al.*, J Immunol, 2011). Thus, these numbers of mice are expected to reveal conclusively whether the agonists have undesired side effects.

Only *in vitro* verified agonists/antagonists will be used to minimise the number of mice used.

B. The animals

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

The disease models in which the agonist/antagonist will ultimately be tested, i.e. respiratory viral infection (appendix #1), house dust mite- and respiratory syncytial virus- induced asthma (appendix #3), and pristane-induced lupus (appendix #6), will employ mice as experimental animal. Hence, the agonists/antagonists *in vivo* characterisation will be performed in mice. Female and male mice (*Mus musculus*) will be used as experimental animals in equal measure. The mice will be housed and bred at the common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University. Mice used in the experiments will be approximately 8-12 weeks of age, which confirms to the majority of mice used in the disease models.

Estimated total number of mice: 100 mice/year for total of 500 mice in 5-year period. Experimental groups will consist of 6 mice, with at least 2 groups (i.e.

12 mice per tested agonist). It is difficult to predict the efficiency by which new, potent inhibitory receptor agonists will be generated, which determines how many mice will be required. Nonetheless, the novel cellular immunisation technique developed by our collaborators at UMaB (hybridoma facility UMC Utrecht) is highly efficient at generating high affinity antibodies, even against lowly immunogenic membrane proteins. Recently, we generated multiple new agonistic antibodies for the mouse inhibitory receptor [REDACTED] using this method, which show great promise in initial *in vitro* experiments. We therefore estimate to require ca. 100 mice per year (on average).

Agonist characterisation

Mice per group: 5

Administration routes: 3

Doses: 3

Number of inhibitory receptors: 4

Number agonists (per receptor): 2

Total number of mice: $(5 \times 3 \times 3 \times 4 \times 2 =) 480$

The estimated grand total number of mice needed is therefore approximately 500 mice

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:

Following full *in vitro* characterisation of the potency of agonists/antagonists, their effects on e.g. depletion have to be assessed *in vivo*. There could be unexpected effects that one would not detect *in vitro*, therefore agonists/antagonists must be characterized *in vivo*. Only those agonists/antagonists that show efficacy *in vitro* will be tested *in vivo*.

Reduction:

Full characterisation of the agonists/antagonists will ensure that only optimal agonists/antagonists will be used in the disease models. Fewer mice will therefore be subjected to the discomfort inherent in the disease models. Agonists/antagonists will be extensively tested *in vitro* for efficacy in targeting an inhibitory immune receptor prior to *in vivo* application. For instance, reporter cell lines that measurably (e.g. by production of fluorescent protein) respond to

signaling by inhibitory receptors will be employed to assess the stimulatory/inhibitory function of agonists/antagonists. Only the most promising agonists/antagonists will be subsequently tested *in vivo*. By not progressing to *in vivo* testing with suboptimal agonists/antagonists, this ensures that the number of mice used is reduced to a minimum.

Refinement:

Mice will be housed in groups in cages with nesting opportunities. The wellbeing of mice will be regularly inspected. If unexpected suffering is observed, mice will be euthanized.

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

The wellbeing of mice will be regularly inspected. If unexpected suffering is observed, mice will be euthanized.

There are no expected adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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?

Administration of the inhibitory immune receptor agonists/antagonists may cause mild transient discomfort e.g. from intraperitoneal injection.

Repeated collection of blood causes discomfort.

No adverse effects on wellbeing are expected to result from the agonist/antagonists themselves nor from possible side effect, such as transient immune cell depletion.

Explain why these effects may emerge.

Handling intrinsically causes discomfort for the mice.

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

Well-trained personnel will handle the mice.

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').

Cumulative levels of discomfort are expected to be mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

To assess e.g. immune cell numbers in compartments other than blood, such as spleen and bone marrow, mice need to be terminated. Removal of these organs is not compatible with continued survival of the mice.

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

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

X Yes



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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	5	Functional and phenotypical characterisation of genetically modified mice

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.

In our project, we will employ mice that have genetic modifications relating to inhibitory immune receptors to study the function and therapeutic potential of these receptors. This includes mice with genetic ablation of endogenous inhibitory receptors and mice with transgenic modifications. Differences between unchallenged modified and wild-type mice can inform us on effects observed in the disease models (described in other appendices). Moreover, steady-state differences between mice and *in vitro* behaviour of cells obtained from unchallenged mice can help elucidate the regulatory roles of specific inhibitory

receptors. We will study the differential (immune) cell numbers in multiple compartments, including blood, bone marrow, spleen, and lymph nodes; analyse histological changes, for instance lung and skin fibrosis; and assess immune cell function *ex vivo*, e.g. migration and production/release of antimicrobial molecules by neutrophils. Since ablation of inhibitory immune receptors could subtly disturb the regulation of the immune system, the effect of which may only be apparent at advanced age, we will also assess these parameters in aged (1-year old) mice. This will provide further insight into the biological role of the inhibitory immune receptors.

Experimental groups

Unchallenged wild-type and genetically modified mice will be compared against each other. For instance, in an *ex vivo* migration assay the groups may look as follows:

1. Young (8-12 weeks old), unchallenged wild-type mice
2. Young (8-12 weeks old), unchallenged genetically modified mice

In an experiment that examines, for instance, the lung function/histology of aged mice the included experimental groups will be:

1. Young (8-12 weeks old), unchallenged wild-type mice
2. Young (8-12 weeks old), unchallenged genetically modified mice
3. Old (up to ca. 1 year old), unchallenged wild-type mice
4. Old (up to ca. 1 year old), unchallenged genetically modified mice

Relation to other experiments

Prior to performing animal experiments, we will study the expression and function of inhibitory immune receptors on immune cells derived from healthy controls and patients. In this setting, we can determine which inhibitory receptors can modulate immune cells thought to be important to the pathogenesis of several immune-mediated diseases. To study the role of these inhibitory receptors, genetically modified mice will be used in animal models of these diseases. Specific effects (phenotypical and functional) of the genetic ablation will be assessed *ex vivo* with cells obtained from unchallenged wild-type and genetically modified mice.

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

The mice will receive no experimental treatment/challenge to treat/induce disease. Some mice will be aged up to ca. 1 year of age under regular housing conditions.

Airway responsiveness in anaesthetized mice

Mice are intraperitoneally anaesthetized with ketamine 125 mg/kg and medetomidine 0.2 mg/kg. The animals are ventilated (O₂/air (1:2)) at a frequency of 150 beats/min. The mice are prepared for the measurement of the following lung parameters: pulmonary resistance (RL) and tidal volume (TV). Increasing doses of methacholine (acetyl- β -methyl-choline chloride) (0.75 -25 mg/ml, 10% puff for 10 seconds) are administered by aerosol generated in a nebulizer.

Using the nebulizer it is possible to adjust the rate of aerosol delivery by adjusting the delivery cycle from 0% to 100%. After the first dose of methacholine, pulmonary resistance (RL) dynamic compliance (Cdyn) and tidal volume (TV) are measured for 3 min, and this procedure is repeated for all doses.

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

None of the genetically modified mice experience discomfort inherent to the genetic modification itself and breeding of the mice is therefore not counted towards the total number of mice used. Possibly, aged mice may experience mild discomfort, but mice kept for breeding will not grow old enough to experience age-related discomfort.

Group sizes will vary based on the type of experiment. For an *ex vivo* experiment such as neutrophil migration, a group size of 3 mice would be sufficient. But when mice are aged to, for instance, assess lung function/histology, groups may reach an size of 10 mice. Power analyses will be based on previous experiments, literature, and pilot experiments.

B. The animals

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

Mice (*Mus musculus*) of both sexes will be used. In the house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma model (appendix #3) as well as systemic lupus erythematosus model (appendix #6) both sexes are also used and the use of both female and male mice as described here will provide further insight into the role of inhibitory immune receptors in those diseases. The mice, both wild type and genetically modified strains, will be housed and bred at the common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University. Several genetically modified strains are already present in the breeding facility, [REDACTED]. Additional genetically modified mouse strains may be obtained from collaborators, including, for instance, [REDACTED]. In general, mice will be around 8-12 weeks old. Aged mice up to ca. 1-year old will also be used.

We reserve a limited number of mice for training purposes. Only (new) group members who will be involved in our research for more than one year will be eligible for training techniques such as blood collection, organ excision, and lung function measurements. Estimated numbers needed: 30 mice/year.

Estimated total number of mice required: 200 mice/year for a total of 1000 mice in the 5-year period. This estimate is based on factors discussed in more detail above. For aging/phenotyping experiments, groups will consist of 10 mice, with at least 4 groups (i.e. 40 mice per experiment) and will be repeated once or twice (i.e. minimum of 80-120 mice per fully confirmed experiment). This will be performed for multiple immune inhibitory receptors, [REDACTED]. *Ex vivo* functional experiments with cells from unchallenged mice will be guided by results obtained with human cells, both healthy controls and patients, and results obtained from the mouse disease models (appendix #1, #3, #6). Hence, it is difficult to predict exactly what experiments will be performed and the number of mice that are required. For example, respiratory syncytial virus-infected [REDACTED]-deficient mice show a significantly greater pulmonary neutrophil influx than wild-type mice, which warranted further *ex vivo* neutrophil migration experiments comparing [REDACTED]-deficient and wild-type neutrophils. This type of experiment requires 2 experimental (unchallenged) groups (i.e. wild-type and genetic knockout) with 3 mice in each group (i.e. 6 mice per experiment), and will be performed at least 3 times (i.e. minimum of 18 mice per fully confirmed [n=3] experiment). Based on the intended aging/phenotyping experiments and experience with *ex vivo* functional tests with cells from unchallenged mice, we estimate that we require ca. 200 mice per year (on average).

Aging experiments

Mice per experiment: 40 (e.g. 10x young WT, 10x young KO, 10x aged WT, 10x aged KO)

Estimated number of inhibitory receptors tested: 4

Number of inhibitory receptors tested: 4
Reproducibility of results: n = 3
Total needed: 40 x 4 x 3 = 480 mice

In vitro experiments:

Mice per experiment: 10 (5x WT, 5x KO)

- Number of mice depends highly on the required cells, e.g. bone marrow is rich in neutrophils, but obtaining sufficient lymph node cells from unchallenged mice is more of a challenge. This is only an educated guess. The cells of interest (and thereby the required number of mice) for *in vitro* experiments will be determined based on data obtained from patient vs. healthy controls and data from the mouse disease models.

Number of inhibitory receptors: 4

Types of experiments: 4 (e.g. migration, immune cell effector functions)

Reproducibility of results: n = 3

Total needed: 10 x 4 x 4 x 3 = 480 mice

Training

A limited number of mice is reserved for training purposes (only for new members that join the research group from more than one year), such as the excision of organs including bone marrow, lymph nodes, spleen, etc.

Expected number of mice needed: 10 / year, for 50 mice in 5-year period.

The estimated grand total number of mice needed is therefore (480 + 480 + 50 = 1010) approximately 1000 mice

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:

Here, we look at the systemic effects of genetic ablation of inhibitory immune receptors in the short- and long-term. Unfortunately, it is not yet possible to simulate the entire immune system, and its interaction with other organs, *in vitro*. Human patients with deleterious mutations are not known or accessible for study, nor would body-wide biopsies be feasible.

Reduction:

Steady-state differences in unchallenged wild-type versus genetically modified mice could provide information useful for the disease models, and strengthen these results. Consequently, fewer mice may need to be used in the disease model experiments. It will also allow us to compare *in vitro* human and mice data to confirm translatability and relevance.

To minimise the number of surplus mice and ensure the highest degree of comparability between wild-type and genetically modified mice, the modified mouse strains will be maintained as heterozygotes. This way, separately maintaining genetically modified and matched wild-type strains is not necessary. This is intended for maintaining the mouse strains, not for breeding mice for experiments. On the eve of experiments, when large numbers of homozygous mice (both genetically modified and wild type) are required, we will temporarily breed mice from homozygous parents to prevent that many heterozygous mice are lost as surplus. Differences due to genetic drift between wild-type and genetically modified mice will be kept to a minimum in this way. This ensures that experimental differences observed between the wild-type and genetically modified mice are due to the intended genetic modification.

Refinement:

Mice will be housed in groups in cages with nesting opportunities. The wellbeing of mice will be regularly inspected. If unexpected suffering is observed, mice will be euthanized.

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

The wellbeing of mice will be regularly inspected. If unexpected suffering is observed, mice will be euthanized. During invasive lung and heart function measurements, mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine.

There are no expected adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

During invasive lung function measurements of a subset of mice, the mice will be fully anaesthetised with ketamine and medetomidine.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There may be mild age-related discomfort in the subset of mice selected for aging experiments.

Explain why these effects may emerge.

Aging may result in mild discomfort as physical fitness declines. This could be amplified in inhibitory receptor-deficient mice. Although effects in previously untested strains of inhibitory receptor-deficient mice are difficult to predict, previous experiments show that 1-year old LAIR-1-deficient mice did not appear to suffer from notable discomfort compared to wild type mice.

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

If unexpectedly severe discomfort is observed, mice will be euthanized.

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').

Cumulative levels of discomfort are expected to be mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

To assess for example immune cell numbers in compartments other than blood, such as spleen and bone marrow, mice need to be terminated. Removal of these organs is not compatible with continued survival of the mice, and neither are invasive lung function measurements.

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

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

X Yes



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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	6	Induced auto-immune disease

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.

Autoimmune diseases can be chemically induced in mice to investigate pathogenesis and treatment. Systemic lupus erythematosus (SLE) will be induced by a single intraperitoneal injection of tetramethylpentadecane (TMPD, or commonly known as pristane). To investigate the biological role of inhibitory immune receptors in lupus pathogenesis, lupus will be induced in genetically modified and wild-type mice. Symptoms will develop over the course of 4-6 months. Disease progression will be scored by the assessment of hypergammaglobulinemia, presence of lupus autoantibodies (e.g. anti-nRNP/Sm and anti-dsDNA)

and the development of renal disease. Endpoint outcome parameters include deposition of glomerular immune complexes and glomerular hypercellularity. These are clinically relevant outcomes.

Experimental groups

Comparisons between wild-type and genetically modified mice will include at least 4 groups:

1. mock-injected wild-type mice
2. mock-injected genetically modified mice
3. pristane-injected wild-type mice
4. pristane-injected genetically modified mice

The basic set-up for an experiment to study the effect of agonists of inhibitory receptors on disease severity will include the following groups:

1. mock-injected wild-type mice treated with control
2. mock-injected wild-type mice treated with agonist
3. pristane-injected wild-type mice treated with control
4. pristane-injected wild-type mice treated with agonist

NB. In case of an agonistic antibody the treatment control will be an isotype-matched control antibody.

This basic set-up could be expanded to include for instance different agonist/control doses, as well as varying frequencies and time points of agonist/control administration depending on the results from pilot experiments. Optimal conditions may vary for different inhibitory receptors

Relation to other experiments

For inhibitory receptors that were shown to limit lupus disease severity/progression, (i.e. exacerbated disease in genetic knockout or antagonist treated mice), we will develop agonists and their potency will be assessed *in vitro*. The most promising agonists will be characterized in wild-type mice and screened for unwanted side effects, such as immune cell depletion (appendix #4). Fully vetted agonists will then be tested for amelioration of lupus disease severity as stipulated here. Specific effects (phenotypical and functional) of the genetic ablation will be assessed *ex vivo* with cells obtained from unchallenged wild-type and genetically modified mice (appendix #5). Investigation of inhibitory immune receptors in other mouse disease models, i.e. respiratory viral infection (appendix #1), and house dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma (appendix #3) will be studied in parallel. Prior to performing animal experiments, we will study the expression and function of inhibitory immune receptors on immune cells derived from healthy controls and patients. In this setting, we can determine which inhibitory receptors can modulate immune cells thought to be important to the pathogenesis of several immune-mediated diseases. Only inhibitory receptors thus shown to potentially limit disease will be tested *in vivo*.

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

Pristane injection

Nature: intraperitoneal injection of approximately 0.5 mL pristane

Frequency: single application

Duration: disease progression will be assessed during ca. 6 months

Administration of agonist or antagonist

Intraperitoneal or intravenous administration of inhibitory immune receptor agonists or antagonists. The exact dose, timing, and frequency of administration are to be determined in future pilot experiments.

In the pristane model of lupus, a single intraperitoneal dose of TMPD results in the development of disease symptoms over the course of 4-6 months. Disease progression will be scored by the assessment of body weight, hypergammaglobulinemia, presence of lupus autoantibodies (e.g. anti-nRNP/Sm and anti-dsDNA) and renal disease. Body weight will be assessed every week. Serum levels of total IgM and IgG as well as the production of autoantibodies will be evaluated by ELISA. To this end, blood (ca. 100 µl) may be drawn once every two weeks by means of superficial tail cuts or mandibular puncture. Determination of proteinuria (dipstick test) will be used to score the development of nephritis. Upon sacrifice of the mice, deposition of glomerular immune complexes and glomerular hypercellularity will be quantified by immunohistochemistry; other (immunological) organs may also be studied by flow cytometry and histology analysis. Depending on the mouse strain (e.g. BALB/c or C57BL/6), animals can also develop signs of arthritis. The severity of the arthritis will be assessed using an established semiquantitative scoring system of 0–4 where 0=normal, 1=mild swelling, 2=moderate swelling, 3=swelling of all joints, and 4=joint distortion and/or rigidity and dysfunction. The cumulative score for all four paws of each mouse (maximum possible score 16, but scores above 10 are not expected) will be used as the arthritis score to represent overall arthritis severity and progression in an animal.

We will study clinically relevant outcome parameters in these mice. We will assess the effect of inhibitory receptors on these outcome parameters by employing genetically modified mouse strains and by the administration of inhibitory receptor agonists or antagonists.

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

Based on estimated variation and the magnitude of biologically significant differences, we expect that a group size of 16 mice is sufficient to detect statistically significant differences, using both male and female mice (Summers *et al.*, *J Autoimmun*, 2010). For mock-treated control mice, a group size of 8 mice is deemed sufficient due to lower variation within groups. Experiments will be repeated once (n=2) to ensure reproducibility of results. Due to the long-term nature of the SLE disease model (ca. 6 months), it is common practice in literature to use sizable experimental groups and confirm the results in two independent experiments, rather than three (Chowdhary *et al.*, *Rheumatology [Oxford]*, 2007; Summers *et al.*, *J Autoimmun*, 2010). Additionally, a number of pilot experiments will be performed to determine optimal dosage, frequency, and timing of inhibitory receptor agonist delivery.

B. The animals

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

Female and male mice (*Mus musculus*) will be used as experimental animals in equal measure. Pristane-induced lupus in mice is a well-established animal model that closely mimics human disease, including key features such as anti-double stranded DNA autoantibody production, an interferon signature, and immune complex deposition-induced nephritis (Reeves *et al.*, *Trends Immunol*, 2009). Clinically relevant parameters can thus be measured in mice. Many essential research tools, including genetic modifications and antibodies, are only available in the mouse system. The mice used in the proposed experiments, both wild-type and genetically modified strains, will be housed and bred at the common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University. Mice used in the experiments will be approximately 8-12 weeks of age, as described in published literature.

In the five-year period of the project, we intend to study the effect of multiple inhibitory immune receptors, [REDACTED] in the lupus model. Depending on the efficiency by which potent agonists to inhibitory receptors are generated, multiple agonists may also be tested. Additionally, a number of pilot experiments will be performed to determine optimal dosage, frequency, and timing of inhibitory receptor agonist delivery.

Estimated total number of mice needed in the 5-year period: 1500 mice. This estimate is based on factors discussed in more detail above.

Experiments with KO mice (proposal figure Phase 2a):

Mice per experiment: 48 (e.g. 8x mock WT, 8x mock KO, 16x pristane WT, 16x pristane KO)

Estimated number of inhibitory receptors tested: 4

Reproducibility of results: n = 2

Total needed: $48 \times 4 \times 2 = 384$ mice

Experiments with agonist treated mice (proposal figure Phase 4):

Mice per experiment: 24 (e.g. 8x mock & control WT, 8x mock & agonist WT, 16x pristane & control WT, 16x pristane & agonist WT)

Estimated number of inhibitory receptors tested: 4

Estimated number of viruses tested: 2

Reproducibility of results: $n = 2$

Total needed: $48 \times 4 \times 2 = 384$ mice

Pilot experiments (e.g. agonist administration during disease model at different intervals or with different doses):

Mice per experiment: 20

Estimated number of inhibitory receptor agonists tested: 4

Different conditions tested: 3 (e.g. timing, dosing, administration route)

Total needed: 240 mice

The estimated grand total number of mice needed is therefore ($348 + 384 + 240 = 1008$) approximately 1000 mice.

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:

Immune responses that induce autoimmune diseases are complex and multifaceted. Interactions between multiple compartments such as bone marrow, circulation, lymphatic system, secondary lymphoid organs, and, particularly in the case of SLE, the kidneys are involved. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course and development of aberrant immune responses and the autoimmune diseases these elicits *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental agonist of inhibitory receptors to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of the disease, such as the deposition of immune complexes in glomeruli. In order to reduce the number of animals used for experimentation, we will first conduct *in vitro* assays using human cells to ensure we only

perform the most relevant experiments *in vivo*. Specifically, the expression and capacity of a particular inhibitory receptor to inhibit immune cells that are important to immune-mediated pathology can be tested using human healthy control and patient material. Only receptors that, based on these results, could potentially impact disease will be tested *in vivo* for their role in the development/severity of SLE. Whether the expression pattern and functional capabilities of the inhibitory receptor are similar in steady-state mice can be assessed using unchallenged mice (as described in appendix #5).

Reduction:

To minimise the number of surplus mice and ensure the highest degree of comparability between wild-type and genetically modified mice, the modified mouse strains will be maintained as heterozygotes. This way, separately maintaining genetically modified and matched wild-type strains is not necessary. This is intended for maintaining the mouse strains, not for breeding mice for experiments. On the eve of experiments, when large numbers of homozygous mice are required (both genetically modified and wild type), we will temporarily breed mice from homozygous parents to prevent that many heterozygous mice are lost as surplus. Differences due to genetic drift between wild-type and genetically modified mice will be kept to a minimum in this way. This ensures that experimental differences observed between the wild-type and genetically modified mice are due to the intended genetic modification.

Refinement:

Mice will be housed in groups in cages with nesting opportunities. Mice will be regularly inspected (twice per week) for the development of clinical symptoms and body weight will be measured. Humane endpoints have been defined. A maximum arthritic clinical score of 12 is allowed in the experiment. If an animal has a score higher than 12, it will be sacrificed immediately. In addition, animals with arthritis scores between 10 and 12 are expected to have difficulty reaching the lid of the cage. Therefore, food and water (gelpacks) will be provided on the floor of the cage. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

Animals with arthritis scores between 10 and 12 are expected to have difficulty reaching the lid of the cage. Therefore, food and water (gelpacks) will be provided on the floor of the cage. Mice suffering from unexpectedly severe discomfort will be euthanized.

There are no expected adverse effects on the environment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

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.

No pain medication will be administered. As pain killers might influence the outcome of the experiments, as they are anti-inflammatory, it is not possible to use these compounds.

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?

Mice may present with mild-erosive arthritis.

Repeated blood collection will cause mild transient discomfort.

Explain why these effects may emerge.

Joint involvement is an feature of lupus. In mice, the frequency of arthritis among pristine-injected mice depends on the strain of the mice (e.g. significantly more common in BALB/c compared to C57BL/6).

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

A maximum arthritic clinical score of 12 is allowed in the experiment. If an animal has a score higher than 12, it will be sacrificed immediately. If mice lose more than 20% of original weight, mice will be euthanised.

Indicate the likely incidence.

The frequency of arthritis among pristine-injected mice depends on the strain of the mice. If any signs of arthritis appear, the severity is expected to be mild. Even mice of a genetic background sensitive to arthritis development (e.g. BALB/c), will only present with mild-erosive arthritis. Scores greater than 10 are not expected to surface.

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').

Cumulative levels of discomfort resulting from induced lupus model are expected to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

Deposition of glomerular immune complexes and glomerular hypercellularity are critical outcome parameters to our study. To examine these, histopathological analyses must be performed on the kidneys. Removal of kidneys is incompatible with continued survival of the mice.

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

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

X Yes

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.572.030
2. Titel van het project : Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune responses
3. Titel van de NTS : Nieuwe behandelmethoden voor schadelijke afweerreacties

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: 14-09-2015
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 23-09-2015 en 21-10-2015
 anderszins behandeld: per email: 26-10-2015
 termijnonderbreking(en) van / tot : 30-09-2015 tot 09-10-2015
23-10-2015 tot 26-10-2015
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 16-11-2015

7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 21-10-2015
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: postdoc en promovendus

- Strekking van de vragen:
 - De DEC vraagt de onderzoekers nog eens uit te leggen dat de verschillende diermodellen die in het project worden gebruikt aantoonbaar passen in de hoofdvraagstelling.
 - Klopt het dat de te gebruiken agonisten niet in het kader van dit project worden geproduceerd maar verkregen worden van de in huis aanwezige faciliteit die een eigen vergunning heeft voor dierproeven?
 - Hoe worden naast de in de aanvraag genoemde en gepubliceerde inhibitory receptors nieuwe kandidaat receptoren gevonden en hoe wordt dat ingepast in het project?

- Strekking van de antwoorden:
- De uitleg is helder en de onderzoekers wijzen erop dat hier extra aandacht aan is besteed in het projectvoorstel om de overkoepelende hoofdvraagstelling beter tot zijn recht te laten komen (pag. 4 en 8). Voorts is op advies van de DEC een figuur toegevoegd die de relatie van de te gebruiken diermodellen met de hoofddoelstelling van het project weergeeft.
- In de tekst staat nu duidelijk vermeld dat de bereiding van de potentieel agonistisch werkende antistoffen gebeurt in een in house faciliteit met een eigen vergunning voor het maken van antistoffen. Nu duidelijk vermeld in het projectvoorstel (pag. 2, 4 en 6)
- Potentieel agonistische antistoffen (en de counterparts daarvan) verkregen van de in house faciliteit worden in in vitro experimenten getest (veelal celkweken) op hun functie en werkzaamheid. Een aanvullende beschrijving is toegevoegd aan het projectvoorstel en in bijlage 4 (pag. 7).
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: 30-09-2015
- Strekking van de vragen:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U noemt drie remmers, maar de DEC heeft het idee dat u ook nog op zoek bent naar andere remmers. Hoe gaat u dat doen en kunt u enig zicht geven op het succes daarvan?
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC zou ter illustratie graag een schema/figuur in het projectvoorstel opgenomen zien, om de samenhang tussen de verschillende bijlagen weer te geven.
- 3.4.1: In de 4e regel van onder staat: "Both house dust mice ...", maar dit moet volgens de DEC mite zijn. Graag wijzigen.
- 3.4.2: Hetgeen geformuleerd is in eerste alinea is sterk gecondenseerd opgeschreven en daardoor niet makkelijk te lezen (bv. betekenis tweede zin is onduidelijk). De DEC raadt u aan dit anders te formuleren.

Alle bijlagen

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Gezien het feit dat het gaat om fundamenteel exploratief onderzoek, raadt de DEC u aan het aantal dieren globaal te onderbouwen en in grote lijnen de benodigde aantallen dieren weer te geven. U dient in ieder geval in de verschillende bijlagen dezelfde berekeningsstrategie te gebruiken. De DEC raadt u aan dit te overleggen met de IvD.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u benauwdheid op te nemen in het scoresysteem. Graag hierover contact opnemen met de IVD.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC gaat ervan uit dat het RSV luciferase model gevalideerd is. Kunt u hier een referentie voor geven?
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De bron van antagonist en agonisten graag opnemen in de aanvraag.

Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U heeft het hier over agonisten en antagonist, maar antagonist worden verder niet meer genoemd in deze bijlage.
- B. De dieren: Omdat u niet alleen ████████ onderzoekt maar ook andere inhibatoire remmers gaat onderzoeken vraagt de DEC zich af of u dan niet ook mannetjes moet gebruiken, net zoals in de overige bijlagen.

Bijlage 3

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u het gebruik van protocadherin-1 deficiënte muizen te onderbouwen. Waarom heeft u gekozen voor dit gen?
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is de DEC niet helder waarom u gebruik maakt van een UV- geïnactiveerd RSV. Wat is de ratio voor de UV-bestraling van het virus?

Bijlage 4

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: U dient hier aan te geven wat u heeft gedaan aan vermindering in de betreffende bijlage, nu is het te algemeen geformuleerd. Graag scherper herformuleren.

Bijlage 6

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af waarom u in deze bijlage rekent met N=2 i.p.v. N=3 zoals in de andere bijlagen. Graag verhelderen.

- Datum antwoord: 09-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Momenteel richten we ons onderzoek voornamelijk op een viertal remmende receptoren, ██████████. Er zijn huidig geen concrete plannen om dit op korte termijn uit te breiden. Geregeld bestuderen wij echter expressiepatronen van meerdere remmende receptoren op immuuncellen. Als bijv. bij

onderzoek met patiëntmateriaal een bepaalde remmende receptor in het oog springt door de wijze van expressie, houden wij graag de mogelijkheid open om verder onderzoek hieraan te wijden.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Een schema dat een globaal beeld van het project schetst is toegevoegd aan de aanvraag, te weten onder kopje 3.4.3 (projectvoorstel, pag. 8).
- 3.4.1: De typfout is verbeterd.
- 3.4.2: Formulering is aangepast ten behoeve van leesgemak.

Alle bijlagen

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Een verder uitgewerkte (uniforme) aantallenberekening is toegevoegd aan de verschillende bijlages.

Bijlage 1

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In overleg met de IvD is benauwdheid opgenomen in het scoresysteem en als apart criterium voor het humaan eindpunt (bijlage 1, pag. 2 pag. 7, pag. 9).
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het gebruik van gemodificeerd RSV dat luciferase tot uitdrukking brengt om in vivo virusrePLICATIE te visualiseren is inderdaad een gevalideerd model, zie bijv. Rameix-Welti et al., Nat Commun, 2014. Dit geldt ook voor andere virussen die luciferase tot uitdrukking brengen, zoals gemodificeerd mouse hepatitis corona virus, welke onze groep eerder heeft gebruikt (■■■■■ ■■■■■). De referenties zijn toegevoegd aan de aanvraag (bijlage 1, pag. 2).
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Een verwijzing naar de hybridomafaciliteit van het UMC Utrecht (UMab), zoals ook vermeld in de projectbeschrijving, is toegevoegd (bijlage 1, pag. 1).

Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Onze focus ligt op het gebruik van agonisten van remmende receptoren om proof-of-concept te verkrijgen voor hun therapeutische toepassingen. Antagonisten zouden kunnen dienen als verdere bevestiging van knock-out modellen, en om een genetische knock-out te simuleren als deze niet beschikbaar is. Deze toelichting is aan de aanvraag toegevoegd (bijlage 2, pag. 1-2).
- B. De dieren: Het doel van dit model is het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de immunrespons die zich voordoet bij virale luchtweginfecties (d.w.z. model/bijlage 1). In het virale luchtweginfectie model gebruiken wij enkel vrouwelijke dieren omdat deze een sterkere (en daarmee schadelijkere) antivirale afweerreactie ten toon stellen dan mannelijke dieren en wij geïnteresseerd zijn in het tegengaan van immun-gemedieerde schade. Vanwege de verergerde immunopathologie bij vrouwelijke dieren zijn deze hier een gevoeliger model voor dan mannelijke dieren. Vandaar dat wij bij de verdere bestudering van

mechanistische aspecten ook enkel vrouwelijke dieren gebruiken. Deze uitleg is toegevoegd aan de aanvraag (bijlage 2, pag. 3)

Bijlage 3

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Recent is een duidelijke associatie tussen bepaalde ██████████ genvarianten met astma en eczeem aangetoond (Koppelman et al., Am J Respir Crit Care Med, 2009; Koning et al., Pediatr Allergy Immunol, 2012). Daarnaast interacteert protocadherin-1 SMAD3, waarvan bepaalde genetische varianten ook met astma geassocieerd zijn (Faura Tellez et al., Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015; Moffatt et al., N Engl J Med, 2010). Preliminair data suggereren dat ██████████
██████████
██████████ deficiëntie lijkt daarom een passende benadering van een genetische aanleg voor astma. Verder blijkt uit pilotexperimenten dat ██████████ deficiënte muizen gevoeliger zijn voor RSV-infectie, aangezien deze o.a. een verergerde immuuncel-influx in de longen vertonen. Deze toelichting is toegevoegd aan de aanvraag (bijlage 3, pag. 1-2).
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: UV-geïnactiveerd virus zal fungeren als controle voor de inoculatie met 'levend' virus. Het UV-geïnactiveerde virus bevat nog steeds immuno-stimulerende componenten zoals virale eiwitten en viraal RNA, maar zal geen productieve infectie op gang brengen. Dit is een betere controle dan enkel fosfaat-gebufferde zoutoplossing (PBS). Deze toelichting is toegevoegd aan de aanvraag (bijlage 3, pag. 2).

Bijlage 4

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Er is nu duidelijker geformuleerd dat vooraf aan het in vivo testen van agonisten/antagonisten eerst in vitro experimenten uitgevoerd zullen worden die duidelijk zullen maken welke agonisten/antagonisten het meest veelbelovend zijn. In vergelijking suboptimale agonisten/antagonisten zullen niet in vivo toegepast worden, hetgeen het aantal benodigde muizen tot een minimum beperkt. (Zie bijlage 4, pag. 3).

Bijlage 6

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het lupus model is een langdurig, chronisch model. Eén experiment neemt (meer dan) zes maanden in beslag. In de wetenschappelijke literatuur is het gebruikelijk om aanzienlijke groepsgroottes te gebruiken (ook om voortijdige uitval op te kunnen vangen, bijv. vanwege ongerief door gevechten tussen muizen die in groepen zijn gehuisvest) en experimenten éénmalig te herhalen om reproduceerbaarheid te garanderen. Deze toelichting is toegevoegd aan de aanvraag (bijlage 6, pag. 3).
- 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 is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, die beoogt de kennis over natuurlijke remmers van de immunologische reactie (zijnde receptoren op cellen die een rol spelen in de afweer) uit te breiden en bewijs te verzamelen dat deze remmende receptoren aangrijpingspunten bieden om ongewenste of uit de hand lopende excessieve en daardoor beschadigende afweerreacties in te tomen. Het wordt ingeschat als meer dan een substantieel belang, omdat er een veelvoud van ziekten bestaat waar een verkeerd gerichte of excessief heftig verlopende afweerreactie zorgt voor ernstige immunopathologie. Te denken valt aan autoimmuunziekten (verkeerd gerichte afweer), infecties met bepaalde virussen en allergische reacties (hyperactiviteit van het afweersysteem). Het kunnen activeren van de remsystemen is het finale doel van dit type onderzoek. De onderzoekers zien hun project als een preklinisch exploratief fundamenteel onderzoek dat gezien het feit dat het nog in de beginfase verkeert breed moet worden ingezet. Het projectonderwerp - remmers van het immuunsysteem - kan gezien worden als complementair aan de ontwikkeling van de zogenaamde checkpoint inhibitors die ervoor zorgen dat een immunologische reactie op gang komt. Checkpoint inhibitors worden inmiddels met succes toegepast in de behandeling (immunotherapie) van een aantal vormen van kanker.

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. De strategie omvat *in vitro* vooronderzoek met menselijk materiaal dat al geleid heeft tot het karakteriseren van een aantal inhibitorische receptoren. Ook zijn in het vooronderzoek al een beperkt aantal dierproeven uitgevoerd die een *proof of concept* hebben laten zien van de mogelijkheid om de demping van de immunologische reactie te verkrijgen door activatie van de inhibitorische receptor, met als gevolg minder immuunpathologie c.q. beschadiging. Het project zet in op het gebruik van een aantal muis diermodellen, te weten een model voor virus-geïnduceerde luchtweginfectie (bijlage 1), ontsteking van de luchtwegen, niet-infectieus geïnduceerd (bijlage 2), huismijt en RSV geïnduceerd astma in een k.o. muizenmodel (bijlage 3) en auto-immuniteit in een model voor SLE (bijlage 6). In bijlage 4 worden de nieuwe te testen agonisten (en antagonist) van de inhibitorische receptoren gekarakteriseerd alvorens te worden gebruikt in de dierproeven. In bijlage 5 worden de genetisch gemodificeerde dieren, gemodificeerd voor de receptoren, nader onderzocht.
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)
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In de bijlagen 1, 2 en 3 is het cumulatieve ongerief ingeschat als matig voor de dieren die geïnfecteerd zijn met een virus (bijlage 1), voor de dieren waarin een steriele ontsteking is geïnduceerd (bijlage 2) en voor de dieren waarin astma optreedt ten gevolge van blootstelling aan huismijt en een virusinfectie (bijlage 3). De score 'matig ongerief' betreft maximaal 75 % van de dieren in deze experimenten; 25 % van de dieren ondergaat mild ongerief. In bijlage 4 en 5, waar respectievelijk agonisten/antagonisten en genetisch gemodificeerde dieren worden gekarakteriseerd, ondergaan de dieren naar schatting licht ongerief. In bijlage 6 is de ongeriefscore geschat op 'matig' in maximaal 75 % van de dieren en op 'licht' in 25 % van de dieren. Gezien het feit dat het hier gaat om exploratief onderzoek zijn de ongerief scores inschattingen op basis van eerdere ervaringen. De verwachting is dat indien de agonisten werken, dat wil zeggen de rem op de immunologische reactie versterken, het percentage dieren dat matig ongerief ondervindt zal dalen.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. *In vitro* vooronderzoek met menselijke cellen heeft geleid tot identificatie van een aantal inhibitorische receptoren. Op deze receptoren wordt in eerste instantie het onderzoek geconcentreerd. Om het hoofddoel te verwezenlijken zijn diermodellen nodig waarin aantoonbare immuunpathologie is opgetreden. Het remmen daarvan is hoofddoel van het project.
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 voor zover mogelijk in een exploratief onderzoek ook onderbouwd. De DEC heeft het advies gegeven aan de onderzoeker om de getallen af te ronden, omdat het niet realistisch is om een exact aantal te benoemen. In bijlage 5, waarin de genetisch gemodificeerde dieren worden beschreven, is aangegeven dat er extra aandacht is voor het voorkomen van fokoverschot door de fok op uitgekende tijden te doen plaatsvinden, zodat zoveel mogelijk onderzoekers van de opbrengst gebruik kunnen maken.
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 ongewenste milieueffecten. De onderzoekers gebruiken in bijlage 1 en 2 vrouwelijke muizen, omdat het vooronderzoek (inmiddels gepubliceerd) heeft aangetoond dat het beloop van de virusinfectie/ longontsteking in vrouwelijke dieren meer immunopathologie toont dan in mannelijke muizen. Effecten van agonisten zijn daardoor met meer kans op succes te bestuderen in vrouwelijke muizen dan in mannelijke muizen.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De doeleinden van dit vernieuwende fundamentele exploratieve project, zoals geformuleerd onder C3, rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van de muizen. De schade die de dieren oplopen is verantwoord, omdat vanuit wetenschappelijk oogpunt verwacht mag worden dat het onderzoek inzicht zal geven in de werking van constitutieve remsystemen in het immuunapparaat zelf, die op termijn mogelijk kunnen worden aangewend om uit de hand lopende immunologische reacties te beteugelen. Gezien het vooronderzoek waarin *proof of concept* is geleverd mag de kans op succes als veelbelovend worden ingeschat. Schade door excessieve immunologische reacties komt voor bij een veelvoud van ziekten. De onderzoekers hebben er daarom voor gekozen drie modellen van ziekte waar immunopathologische schade evident is in het onderzoek te betrekken. De DEC steunt deze brede aanpak mede, omdat dit type onderzoek nog in de beginfase verkeert. Dit alles overwegende oordeelt de DEC unaniem dat het belang van het doel van het project opweegt

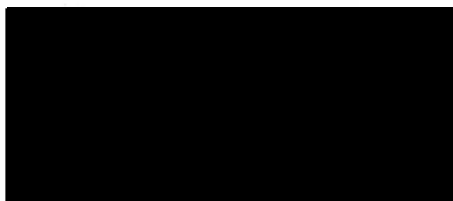
tegen het ongerief dat de muizen zullen ondervinden. De DEC acht het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar.

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

Instantie voor Dierenwelzijn 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
AVD115002015322

Bijlagen

2

Datum 24 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015322. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

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: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 30244197
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 
Functie: 
Afdeling: 
Telefoonnummer: 
E-mailadres: 

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2016
Geplande einddatum: 31 december 2020
Titel project: Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune respons
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe behandelmethoden voor schadelijkeafweerreacties
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: 23 november 2015

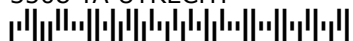


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht

Postbus 80011

3508 TA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015322

Bijlagen

2

Datum 24 november 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 november 2015

Vervaldatum: 24 december 2015

Factuurnummer: 15700322

Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015322	€ 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

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
AVD115002015322

Uw referentie
-

Bijlagen
1

Datum 28 december 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 24 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune responses" met aanvraagnummer AVD115002015322. 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:

Projectvoorstel

Onduidelijkheden

- Wij begrijpen dat het aantal te gebruiken dieren een schatting is. Echter, de inschatting van het aantal dieren dient beter onderbouwd te worden. U geeft bijvoorbeeld in appendix 1 en 2 aan dat u meerdere virussen/inflammatory mediators gaat testen. Daarnaast geeft u in appendix 1, 2, 3, 5 en 6 aan dat de experimenten meerdere keren worden uitgevoerd om de reproduceerbaarheid te testen. Kunt u de beslismomenten beter beschrijven, wanneer u bijvoorbeeld beslist om een tweede virus te testen en waarop u de beslissing baseert om een experiment wel/niet te herhalen?
- Appendix 2, vraag B. Hier wordt op pagina 4 bij de 4^e paragraaf gesproken over Estimated number of viruses tested. Wij nemen aan dat u hiermee bedoelt estimated number of inflammatory mediators tested. Kunt u dit bevestigen?
- In appendix 5 beschrijft u dieren nodig voor trainingsdoeleinden. Het aantal dieren dat u hiervoor nodig denkt te hebben is 30 per jaar (2^e alinea vraag B) of 10 per jaar (10 dieren per jaar). Het is ons niet duidelijk welk aantal correct is. Kunt u dit consistent maken?

- In appendix 5 beschrijft u een fok met dieren waarbij de dieren op latere leeftijd ongerief kunnen ondervinden van de genetische modificatie. U geeft aan dat deze dieren dit ongerief echter niet zullen ondervinden omdat zij deze leeftijd niet zullen bereiken. Omdat deze dieren wel risico lopen dit ongerief te ondervinden, moet deze fok wel als dierproef worden beschouwd en heeft u voor deze fok een vergunning nodig in het kader van de Wod. U dient deze fok dus op te nemen in onderliggende aanvraag, of hiervoor een aparte aanvraag in te dienen.

Datum
28 december 2015
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015322

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

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



Instantie voor
Dierenwelzijn
Utrecht

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

postadres
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

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

uw kenmerk
ons kenmerk

datum 13 januari 2016
onderwerp Antwoorden AVD115002015322

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw e-mail d.d. 28 december 2015.

Met vriendelijke groet





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

████████████████████
████████████████████
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002015322

Uw referentie
-

Bijlagen
1

Datum 28 december 2015
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████

Op 24 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune responses" met aanvraagnummer AVD115002015322. 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:

Projectvoorstel

Onduidelijkheden

- Wij begrijpen dat het aantal te gebruiken dieren een schatting is. Echter, de inschatting van het aantal dieren dient beter onderbouwd te worden. U geeft bijvoorbeeld in appendix 1 en 2 aan dat u meerdere virussen/inflammatory mediators gaat testen. Daarnaast geeft u in appendix 1, 2, 3, 5 en 6 aan dat de experimenten meerdere keren worden uitgevoerd om de reproduceerbaarheid te testen. Kunt u de beslismomenten beter beschrijven, wanneer u bijvoorbeeld beslist om een tweede virus te testen en waarop u de beslissing baseert om een experiment wel/niet te herhalen?
- Appendix 2, vraag B. Hier wordt op pagina 4 bij de 4^e paragraaf gesproken over Estimated number of viruses tested. Wij nemen aan dat u hiermee bedoelt estimated number of inflammatory mediators tested. Kunt u dit bevestigen?
- In appendix 5 beschrijft u dieren nodig voor trainingsdoeleinden. Het aantal dieren dat u hiervoor nodig denkt te hebben is 30 per jaar (2^e alinea vraag B) of 10 per jaar (10 dieren per jaar). Het is ons niet duidelijk welk aantal correct is. Kunt u dit consistent maken?

- In appendix 5 beschrijft u een fok met dieren waarbij de dieren op latere leeftijd ongerief kunnen ondervinden van de genetische modificatie. U geeft aan dat deze dieren dit ongerief echter niet zullen ondervinden omdat zij deze leeftijd niet zullen bereiken. Omdat deze dieren wel risico lopen dit ongerief te ondervinden, moet deze fok wel als dierproef worden beschouwd en heeft u voor deze fok een vergunning nodig in het kader van de Wod. U dient deze fok dus op te nemen in onderliggende aanvraag, of hiervoor een aparte aanvraag in te dienen.

Datum

28 december 2015

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD115002015322

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

Leges

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post

- **Wij begrijpen dat het aantal te gebruiken dieren een schatting is. Echter, de inschatting van het aantal dieren dient beter onderbouwd te worden. U geeft bijvoorbeeld in appendix 1 en 2 aan dat u meerdere virussen/inflammatory mediators gaat testen. Daarnaast geeft u in appendix 1, 2, 3, 5 en 6 aan dat de experimenten meerdere keren worden uitgevoerd om de reproduceerbaarheid te testen. Kunt u de beslismomenten beter beschrijven, wanneer u bijvoorbeeld beslist om een tweede virus te testen en waarop u de beslissing baseert om een experiment wel/niet te herhalen?**

Het gebruik van een virus is afhankelijk van resultaten die voortkomen uit experimenten met materiaal van patiënten en gezonde controles. Als uit *in vitro* experimenten blijkt dat een specifieke remmende receptor cellen reguleert waarvan wordt gedacht dat deze een belangrijke rol spelen bij de (schadelijke) afweerreactie tegen een bepaald virus, dan zal infectie met dit virus getest worden in muizen waarbij deze receptor ontbreekt. Dit zal per receptor en virus combinatie bekeken worden. Het gebruik van ieder virus zal eerst *in vitro* ondersteund worden (ook in het geval van meerdere virussen in muizen met dezelfde genetische modificatie). *A priori* is niet met zekerheid vast te stellen of een effect van een remmende receptor virus-specifiek is, waaruit volgt dat mogelijk meerdere virussen getest worden in een muis met dezelfde genetische modificatie.



De huidige *modus operandi* binnen de immunologie dicteert dat experimenten tweemaal herhaald worden (d.w.z. drie onafhankelijke experimenten), waarbij veelal de representatieve resultaten van één experiment getoond worden in publicaties met mogelijk de overige experimenten als bijlage. Zonder herhaling zijn de resultaten van het experiment niet te publiceren, aangezien de *peer review* niet zal worden doorstaan. In uitzonderlijke gevallen, zoals langlopende (maanden durende) dierenexperime met



Bij de herhaling van experimenten ligt onze voorkeur bij reproduceren boven repliceren. Bij een langlopend muisexperiment kan bijvoorbeeld in een eerste experiment naar de acute fase gekeken worden. Vervolgens kan dit herhaald worden met een langer lopend

experiment dat de chronische fase bekijkt, waarin ook de eerdere resultaten van de acute fase bevestigd kunnen worden (Ramos *et al.*, Ann Rheum Dis, 2015). Bij een respiratoire infectie kan een initieel experiment herhaald worden met een titratie van de virusdosis om additionele data te winnen en oude resultaten te bevestigen [REDACTED]

Desalniettemin blijft enige vorm van replicatie noodzakelijk. Biologische systemen vertonen stochastisch processen en het immuunsysteem wordt beïnvloed door een veelvoud aan lastig beheersbare variabelen. Hieronder vallen bijvoorbeeld: variatie tussen batches van toegediende virussen en/of antilichamen, samenstelling van het microbioom van de muizen, stress bij de muizen door verzorging gerelateerde en experimentele handelingen (bijv. mannelijke dierverzorgers induceren door lichaamsgeur meer stress bij knaagdieren dan vrouwelijke verzorgsters [Sorge *et al.*, Nat Methods, 2014]), hormonale status van vrouwelijke muizen, en circadiaans ritme van de muizen. De kans dat een onbeheersbare, en mogelijk onbekende, versturende factor de uitkomst van het experiment beïnvloed is altijd aanwezig. Dit kan worden ondervangen door het experiment minstens éénmalig te herhalen.

Ten slotte kan er in de voorbereiding en uitvoering van een experiment helaas altijd sprake zijn van menselijke fouten die resultaten kunnen vertroebelen. Muizen en monsters kunnen verwisseld worden. Bij virustitraties en dosisberekeningen kunnen fouten gemaakt worden. Uiteraard is dit zeer onwenselijk en worden er waar mogelijk maatregelen genomen om dit te voorkomen. Zo wordt na afloop van een experiment de genetische modificatie op eiwitniveau bevestigd (m.b.v. bijv. *flow cytometry*) om verwisseling van materiaal tegen te gaan. Echter, menselijke fouten zijn bij experimentele interventies nooit volledig uit te sluiten. Door herhaling kunnen deze fouten op het spoor gekomen worden en voorkomen worden dat ze in de wetenschappelijke literatuur terecht komen.

Ervaring binnen ons instituut toont aan dat twee vergelijkbare experimenten die met grote zorgvuldigheid en toereikende power zijn uitgevoerd desalniettemin verschillende resultaten kunnen opleveren (Meulenbroek, *et al.*, Chapter 6, ISBN: 978-90-6464-723-9; <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/287127>). Om met zekerheid onze resultaten te kunnen publiceren is het bevestigen van onze eigen bevindingen essentieel. Reproduceerbaarheid is een leidend beginsel in de wetenschap en om hieraan gehoor te geven achten wij het noodzakelijk om eigen experimenten te herhalen.

- **Appendix 2, vraag B. Hier wordt op pagina 4 bij de 4e paragraaf gesproken over Estimated number of viruses tested. Wij nemen aan dat u hiermee bedoelt estimated number of inflammatory mediators tested. Kunt u dit bevestigen?**

De Commissie heeft gelijk. Het betreft in bijlage 2 inderdaad 'inflammatory mediators' en niet 'viruses.'

- **In appendix 5 beschrijft u dieren nodig voor trainingsdoeleinden. Het aantal dieren dat u hiervoor nodig denkt te hebben is 30 per jaar (2e alinea vraag B) of 10 per jaar (10 dieren per jaar). Het is ons niet duidelijk welk aantal correct is. Kunt u dit consistent maken?**

Het betreft hier een per abuis overgebleven alinea uit een eerdere versie van de bijlage #5. Het correcte aantal is 10 dieren per jaar (totaal: 50 dieren in 5 jaar).

- **In appendix 5 beschrijft u een fok met dieren waarbij de dieren op latere leeftijd ongerief kunnen ondervinden van de genetische modificatie. U geeft aan dat deze dieren dit ongerief echter niet zullen ondervinden omdat zij deze leeftijd niet zullen bereiken. Omdat deze dieren wel risico lopen dit ongerief te ondervinden, moet deze fok wel als dierproef worden beschouwd en heeft u voor deze fok een vergunning nodig in het kader van de Wod. U dient deze fok dus op te nemen in onderliggende aanvraag, of hiervoor een aparte aanvraag in te dienen.**

De Commissie lijkt te verwijzen naar de volgende passage uit de “Working document on genetically altered animals,” waarin inderdaad het afvoeren van dieren vóór het optreden van ongerief als gevolg van de genetische modificatie als onvoldoende beoordeeld wordt.

*“Genetically altered lines which retain a risk of the development of a **harmful phenotype** (e.g. age onset of disease or tumours; risk of infection due to compromised immune system) regardless of the applied refinement (e.g. barrier conditions, culling at early age), in line with Article 1(2), their breeding requires project authorisation as the application of refinement does not eliminate the risk.”*



Verder worden heterozygote muizen gebruikt voor de instandhouding van lijnen. Heterozygote muizen vertonen geen fenotype. Homozygote muizen worden gebruikt voor de in de aanvraag voorgestelde experimenten.



Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres
Bolognalaan 50
3584 CJ Utrecht

postadres
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

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

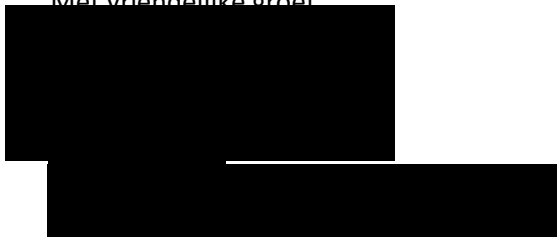
uw kenmerk
ons kenmerk

datum 15 januari 2016
onderwerp Antwoorden AVD115002015322

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw e-mail d.d. 14 januari 2016.

Met vriendelijke groet



Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>

Datum: 14 Jan 2016 16:27:02 GMT+1

Aan: "[REDACTED]"

Kopie: [REDACTED]

Beste Heer de Leeuw,

Dank voor het toezenden van de antwoorden op de gestelde vragen betreffende aanvraag AVD115002015322.

Nog niet alles is ons echter volledig duidelijk nu.

- 1) Betreffende de herhaling van experimenten. Het is ons helder dat experimenten herhaald moeten worden om reproduceerbaarheid aan te tonen. We kunnen ons echter voorstellen dat niet alle experimenten 3x hoeven worden uitgevoerd. Als bijvoorbeeld uit de eerste 2 experimenten geen effect van een bepaalde receptor wordt aangetoond, wordt dit experiment dan nog een derde keer uitgevoerd? Kunt u de criteria beschrijven op basis waarvan u besluit een experiment voor een tweede of derde keer uit te voeren?
- 2) Wat betreft de fok van de genetisch gemodificeerde dieren met mogelijk ongerief op latere leeftijd. Hiermee refereerde de CCD inderdaad aan de passage uit het "working document on genetically altered animals". In uw antwoord dd 13 januari 2015 schrijft u over jarenlange ervaring met de lijnen in kwestie, terwijl u in bijlage 5 van de aanvraag schrijft over "previously untested strains" en "This could be applied in inhibitory receptor-deficient mice". Dit lijkt niet met elkaar overeen te komen. Kunt u dit nogmaals verhelderen?

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

1) Betreffende de herhaling van experimenten. Het is ons helder dat experimenten herhaald moeten worden om reproduceerbaarheid aan te tonen. We kunnen ons echter voorstellen dat niet alle experimenten 3x hoeven worden uitgevoerd. Als bijvoorbeeld uit de eerste 2 experimenten geen effect van een bepaalde receptor wordt aangetoond, wordt dit experiment dan nog een derde keer uitgevoerd? Kunt u de criteria beschrijven op basis waarvan u besluit een experiment voor een tweede of derde keer uit te voeren?

Als de eerste herhaling het voorafgaande experiment volledig ondersteunt, dan zal er inderdaad niet voor gekozen worden om dit een derde maal te testen. Ieder experiment zal minstens tweemaal uitgevoerd worden, vanwege de eerder beschreven redenen. Bij volledige overeenstemming tussen de twee experimenten zal niet over worden gegaan tot een derde experiment. Als echter reden tot twijfel blijft bestaan (bijv. de grootte van het effect varieert sterk tussen de twee experimenten), wordt uitsluitel gezocht aan de hand van een tweede herhaling.

2) Wat betreft de fok van de genetisch gemodificeerde dieren met mogelijk ongerief op latere leeftijd. Hiermee refereerde de CCD inderdaad aan de passage uit het “working document on genetically altered animals”. In uw antwoord dd 13 januari 2015 schrijft u over jarenlange ervaring met de lijnen in kwestie, terwijl u in bijlage 5 van de aanvraag schrijft over “previously untested strains” en “This could be amplified in inhibitory receptor-deficient mice”. Dit lijkt niet met elkaar overeen te komen. Kunt u dit nogmaals verhelderen?

Het blijkt dat een te algemene formulering door ons de verwarring veroorzaakt. Wij kunnen namelijk de mogelijkheid niet volledig uitsluiten dat bij genetische deletie van een zekere remmende receptor muizen van gevorderde leeftijd last ondervinden die toe te schrijven is aan die deletie. Echter, van alle muislijnen die wij momenteel in fok hebben, waaronder Lair1^{-/-} muizen, kunnen wij met zekerheid zeggen dat op gevorderde leeftijd deze muizen geen aantoonbaar ongerief ondervinden die inherent is aan de genetische modificatie. Bovendien, uit de literatuur is verder bekend dat muizen met genetische modificaties in inhibitorische receptoren over het algemeen hieraan geen ongerief ondervinden als zij enkel gefokt worden, ook niet op gevorderde leeftijd. Enkel als de muizen worden blootgesteld aan een experimentele setting, zoals infectie met een virus, kunnen de genetisch gemodificeerde dieren mogelijk hoger ongerief ondervinden dan wildtype muizen. Hoewel de genetisch gemodificeerde muizen op gevorderde leeftijd mogelijk veranderingen in het immuunsysteem vertonen, wat voor ons van interesse is, gaat dit niet direct gepaard met ongerief.

Momenteel hebben wij geen plannen om een muislijn in fok te nemen die ongerief ondervindt die inherent is aan zijn genetische modificatie buiten experimenten om. Zou hier later wel sprake van zijn, dan wordt een nieuwe aanvraag ingediend om de fok van deze dieren te ondervangen.

Vriendelijke groeten,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor Dierenwelzijn 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
AVD115002015322

22 JAN 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 24 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune respons" met aanvraagnummer AVD115002015322. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 januari 2016 en 15 januari heeft u uw aanvraag aangevuld. Deze aanvulling betrof een nadere onderbouwing van het aantal te gebruiken dieren, tekstuele verduidelijking en nadere uitleg van het fenotype van de te gebruiken GMO's. Deze aanvullingen zijn op ons verzoek verstrekt.

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 "Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune respons" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 januari 2016 tot en met 31 december 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 16 november 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 echter wel enkele algemene voorwaarden.

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:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 januari 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project "Inhibitory immune receptors as therapeutic targets to dampen injurious immune respons" met aanvraagnummer AVD115002015322, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 november 2015, ontvangen op 24 november 2015;
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 januari 2016 en 15 januari 2016.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Respiratory viral infections	Muizen (Mus musculus) / WT en GMO	1500	Matig / moderate	
Non-infectious pulmonary inflammation	Muizen (Mus musculus) / WT en GMO	500	Matig / moderate	
House dust mite- and respiratory syncytial virus-induced asthma	Muizen (Mus musculus) / WT en PCDH1-deficient	1500	Matig / moderate	
Characterisation and testing of inhibitory immune receptor agonists	Muizen (Mus musculus) / WT	500	Licht / mild	
Functional and phenotypical characterisation of genetically modified mice	Muizen (Mus musculus) / WT en GMO	1000	Licht / mild	
Induced auto-immune diseases	Muizen (Mus musculus) / WT en GMO	1000	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 goedkeuring van de IvD verkrijgen.

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 onvereenigbaar 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.

Inventaris Wob-verzoek W16-09S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015326								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x			x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x			x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling				x		x	x	
10	Meldingsformulier aanvulling				x		x	x	
11	Projectvoorstel herzien				x			x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x			x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien				x			x	
14	Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien				x			x	
15	Bijlage beschrijving dierproeven 4 herzien				x			x	
16	Mail onderzoeker 3-2-2016				x		x	x	
17	Advies CCD		x						x
18	Beschikking en vergunning				x		x	x	



15 DEC 2015

ADV104002015326

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 10400																
		<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>Wageningen University</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>9215846</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Akkermaalsbos 12</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>59</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6700 AB Wageningen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL10 RABO 0397066465</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Wageningen UR</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Wageningen University	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	9215846	Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12	Postbus	59	Postcode en plaats	6700 AB Wageningen	IBAN	NL10 RABO 0397066465	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
Naam instelling of organisatie	Wageningen University																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	9215846																	
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12																	
Postbus	59																	
Postcode en plaats	6700 AB Wageningen																	
IBAN	NL10 RABO 0397066465																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																	
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>																	
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></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres			
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.																
Functie																		
Afdeling																		
Telefoonnummer																		
E-mailadres																		

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2016 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bepalen van de kwaliteit van eiwitbronnen voor humane voeding
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|----------------------------------|
| Naam DEC | DEC-WUR |
| Postadres | Postbus 9101, 6700 HB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- 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 — via Net FTP verzonden

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel + 4 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- DEC-advies
- X bestelorder WUR914590


6 Ondertekening


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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

Functie 

Plaats Wageningen

Datum 14 - 12 - 2015

Handtekening 





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.

Not only protein quantity, but also protein quality is important in maintaining essential body functions. Therefore, assessing protein quality has been identified as a critical question by international authorities (FAO, 2013). Protein nutritional quality is related to the capacity of the different food sources of protein to achieve the different functions associated to the supply of nitrogen and amino acids in the body. The

nutritional efficiency of a protein can be determined from the extent to which dietary protein nitrogen is absorbed and retained by the organism and is able to balance daily nitrogen losses. The capacity to provide an adequate profile of bioavailable indispensable amino acid is considered as a limiting factor for protein quality.

For this purpose, an amino acid scoring approach was designed, considering the capacity of a protein source ingested at the level of the mean protein requirement derived from nitrogen balance (0.66 g/kg/d for human adults) to meet indispensable amino acid needs. A refinement of this approach, the Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PD-CAAS), is currently widely adopted, and corrects the content of each indispensable amino acid of the protein by the faecal digestibility of the protein in order to evaluate the bioavailable part of these amino acids in comparison to a reference amino acid profile.

The use of a single value for crude protein digestibility to correct the dietary amount of each individual amino acid for its digestibility is considered a short-coming, when there are practically important quantitative differences in digestibility between crude protein and individual dispensable and indispensable amino acids. A further inherent shortcoming of the PD-CAAS approach is that correction of digestibility is based on an estimate of crude protein digestibility determined over the total digestive tract (i.e. faecal digestibility). Thus, microbial metabolism and interconversions of nitrogenous compounds disturb the estimation of bioavailable amino acids. For protein as a whole, absorption of nitrogen over the whole digestive tract is an appropriate measure, as nitrogen absorbed in forms other than amino acids can contribute to the nitrogen economy. For the assessment of bioavailable amino acids, however, the FAO (2013), based on critical reviews of the literature, has recommended that protein quality assessment should be based on true ileal digestibility values of individual amino acids, rather than the overall (faecal) digestibility of protein. This method is referred to as the Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS). At the present time, there is a limited quantity of data on the ileal amino acid digestibility of foods as determined in humans. Where human data are lacking, the FAO (2013) recommends that true ileal amino acid digestibility values from the growing pig be used, being preferred over those obtained from the growing laboratory rat.

While accepting the need for DIAAS estimates of human foods using the ileal cannulated pig as a model, in the same report, the FAO (2013) identifies an urgent need to develop techniques that can be adopted to assess protein quality (amino acid availability) in humans directly, using minimally invasive techniques. In this way, future estimates for true ileal digestibility values would not require ileal cannulated pigs for the standard evaluation of protein quality, but could also be used in different human populations.

Reference:

Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation, FAO Food and Nutrition Paper 92, ISBN 978-92-5-107417-6, FAO 2013

3.2 Purpose

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

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?
- To provide reliable DIAAS for 28 protein sources for human nutrition using the ileal cannulated pig (as indicated by the FAO, 2013 and detailed by the FAO expert working group, 2014).
- To develop a meal/plasma signature dual stable isotope-based approach using intrinsic labelled proteins for the non-invasive evaluation of protein digestibility, amino acid bioavailability and protein nutritional quality for humans.

Reference:

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

Feasibility of the project:

The first objective is feasible. Although the use of ileal cannulated pigs as a model for evaluating protein quality in humans is new, it is commonly applied for evaluation of protein quality in pig nutrition. It has been applied previously at [REDACTED]. This project is part of a larger, international research effort in which a larger number of protein sources for humans are evaluated using

the pig model. Alignment of procedures is ensured, and inter laboratory comparison is foreseen. For a limited number of protein sources (10), comparison with human ileal amino acid digestibility values is planned, following the recommendations of the FAO (2013), using two methods. The first method uses humans with a normal gastrointestinal tract and uses naso-ileal intubation to sample digesta from the terminal ileum (Deglaire et al., 2009). This method will be [REDACTED] at [REDACTED].

This method will be [REDACTED] at [REDACTED].

The second objective concerns the development of a methodology which is minimally invasive and can be applied in healthy humans. This method, proposed by [REDACTED] has not been performed before. The method will be developed by [REDACTED]

The novelty of the method is not in the techniques applied, but in the combination of different isotope labels, simultaneously administered to subjects. Validation of the isotope method against the well-established DIAAS method is required before implementation in humans, and is part of this application. Testing the isotope method in humans is planned in 2016, but is outside the scope of this application.

3.3 Relevance

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

Both protein quantity and protein quality are of importance for maintaining body functions like, the immune system, muscle mass and growth. As protein resources for human consumption worldwide are limiting, protein quality is of increasing importance. As acknowledged by the FAO (2013), there is an immediate need to replace the old standards for assessing protein quality (PD-CAAS) by methods based on ileal disappearance of amino acids, using the pig as a model. In addition, for the somewhat longer term, there is a need to develop non-invasive and easy to implement approaches and methods for the measurement of protein and amino acid digestibility and bioavailability for different protein sources in different populations.

3.4 Research strategy

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

Within the present project, we plan to develop a novel, stable isotope based technique to measure protein quality in humans, at the same time building a database on DIAAS values for 28 protein sources for humans, using a well-established methodology based on pigs. The isotope method is also developed in pigs, and it is planned to test this later in humans (outside the scope of this application). A cross-validation between methods is included in the project.

Building the database on DIAAS values for 28 human food sources will be conducted in 6 subsequent experiments. Within each experiment, 5 food sources will be tested, and a measurement of net endogenous protein losses at the terminal ileum will be included. To this end, each experiment will be conducted as a 6x6 latin square design with 6 treatments tested in all of 6 pigs in 6 subsequent periods. The 6 treatments include 5 different human protein sources and a protein free treatment for the measurement of endogenous ileal protein losses. In total, this will provide data on 30 protein sources (6 x 5). True digestibility values will be calculated by difference, and provide results that can be compared with the isotope methodology. One of the protein sources will be included in three experiments, providing the possibility to test repeatability. In addition, as this is part of a larger, international program, inter-laboratory comparison of 10 protein sources is planned. The selection of the 28 protein sources will be based on their quantitative importance for protein supply in humans worldwide and on their contrast in estimated protein digestibility.

For the development of the isotope method (principle is described in the appendix), milk proteins will be labelled with ¹⁵N and ²H by intraruminal infusion of ¹⁵N labelled ammoniumsulfate and ²H labelled water.

Subsequently, milk will be collected and milk proteins isolated and dried. In addition to these intrinsically labelled protein sources, a universally labelled ^{13}C labelled amino acid source will be purchased (^{13}C spirulina hydrolysate, 99% enriched).

Subsequently, these intrinsically labelled protein sources will be used for the development of the isotope method. The principle of the method is based on the different dilution of labels and is further explained in the experimental protocols. Briefly, all three labels are orally provided with a normal meal to pigs in a frequently fed manner to simulate steady state conditions. Each pig will be provided with two subsequent meals.

It is hypothesized that this increase in the isotopic ratio quantitatively reflects the increase in amino acids absorbed, and can therefore be also applied to measure differences in DIAAS scores, resulting from differences in protein digestibility.

In order to develop this methodology, three assumptions need to be verified prior to an independent validation against the DIAAS method:

- 1) Verify that the ratio of amino acids in the blood is proportionally related to the quantity of ^2H -labelled amino acids which are absorbed.
- 2) Verify that protein bound amino acids lead to a similar response under steady state conditions (i.e. in frequently fed pigs) than a mixture of amino acids in free form (^{13}C labelled, high enrichment, low dose).
- 3) Verify that amino acid metabolism in the intestinal wall or liver does not change the ratio of in amino acids.

These assumptions will be tested in pigs that are equipped with catheters in the portal and jugular veins. Assumption 3 can be tested by comparison of the ratios of in amino acids between the diet, portal and jugular blood plasma.

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

This project comprises two parts: a) building a database of DIAAS scores of 28 protein sources for humans, using the ileal cannulated pig as a model; this will be performed in 6 subsequent animal experiments. b) development of an isotope methodology to assess protein quality. This will require 3 subsequent animal experiments: 1) the production of intrinsically labelled milk protein from cow's milk; 2) evaluation of the main assumptions listed above in an experiment with pigs equipped with catheters in portal and jugular veins; 3) comparison of the developed isotope methodology to determine the isotopic signature of a protein, assessment of protein digestibility with tracer method in plasma compared with true ileal digestibility. This will be performed using ileal cannulated pigs (for measurement of DIAAS scores) that are equipped with a catheter in the jugular vein (isotope methodology).

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.

For a description see 3.4.2. Milestones include the database of DIAAS scores of 28 human protein sources developed in part a; and a developed isotope method (part b) that can be applied for assessing protein quality in humans by the simple measurement of ratios in amino acids in plasma sampled from the peripheral circulation. This method will be tested in humans following procedures similar to the experiment in pigs (peripheral blood only). Although this experiment is outside the scope of this application, it will be conducted in close collaboration with the research in pigs, described in this application.

Building the database (part a) and the development of the isotope method (part b) can be conducted in parallel. Within part b, three phases can be distinguished, which follow the three experiments described in 3.4.2.

Should the results of phase 2 indicate that the assumptions are not valid, phase 3 will not be conducted.

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	6 subsequent pig trials, conducted in a 6x6 latin square (6 ileal cannulated pigs, 6

	periods) each measuring DIAAS scores of 5 human protein sources, and a protein-free treatment to measure net ileal endogenous losses.
2	Production of ██████████ milk protein by directly infusing ██████████ into the rumen of a cow and production of ² H-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing ██████ into the rumen of a cow; subsequently collecting the milk and isolating the milk proteins.
3	To develop the isotope methodology in pigs, testing the main assumptions in pigs equipped with catheters in the portal and jugular veins.
4	Validation of the isotope method against the DIAAS score method using pigs equipped with ileal cannulas and a catheter in the jugular vein; testing four ² H labelled protein sources and a protein-free treatment in a 5x5 latin square design.
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	1	6 subsequent pig trials, conducted in a 6x6 latin square (6 ileal cannulated pigs, 6 periods) each measuring DIAAS scores of 5 human protein sources, and a protein-free treatment to measure net ileal endogenous losses. In the description below, 1 trial is explained

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.

Six pigs (and two spare pigs) will be fitted with a T cannula in the distal ileum. After a recovery and adaptation period, each pig will be subjected to all of six experimental diets in 6 periods in a 6x6 latin square design. During each period, ileal effluents will be collected. DIAAS scores will be calculated from amino acid analysis in the diet and in ileal digesta, using TiO₂ as the indigestible marker. Treatments will include five protein sources and a protein-free diet. Protein losses at the terminal ileum when feeding the protein-free diet are assumed to represent the net endogenous secretions.

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

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

This experiment is not designed to detect statistically significant differences between protein sources. It is designed to provide reliable estimates of DIAAS scores of the selected protein sources, building up a database. The number of observations planned is following the FAO guidelines (2014). Nonetheless, data will be analysed using a generalized linear mixed model. A normal distributed error and identity link will

be assumed for DIAAS scores, but these assumptions will be verified. Pigs within period will be considered the experimental unit. Protein source and period will be included as fixed effects, and pig as random effect to account for repeated observations within pigs. Although this approach is new for the estimation of true digestible amino acids protein sources for humans, it is commonly applied for evaluation of protein sources for pig nutrition, obtaining 5 or 6 observations for each protein source to be tested, and demonstrated to allow detection of significant difference of DIAAS scores of 2-3% between protein sources. One of the protein sources will be included in three trials, allowing estimation of repeatability. In addition, for 10 protein sources that are also tested in two other institutes, inter-laboratory comparisons will be performed.

B. The animals

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

In each of the 6 subsequent pig trials, 8 growing barrows (\pm 25 kg BW) will be purchased. Male animals will be used to ease collection of faeces without contamination with urine. Barrows will be used as entire males will be difficult to handle at the end of the trials. Surgery will be performed on all pigs, following procedures as included in [REDACTED]. Slight modifications with regard to the type of cannula and location will be made to ensure alignment of procedures with other institutes within the international consortium. Two pigs will be considered as spare animals, and will be used in the case of problems with digesta collections in the other animals. The number of spare pigs is based on previous experience, needed to ensure a complete set of 6 observations for each protein source. If pigs are replaced by spare pigs during the experiment, observations can be included in the statistical analyses, provided that these pigs have been used for at least two of the experimental periods. To this end, spare pigs will be treated as their peers, and randomly assigned to a dietary treatment during each period. In the event that observations from another pig cannot be used, the samples obtained from the spare pigs will be analyzed, provided that they are obtained at the desired experimental treatment. Pigs will be about 30 kg BW at the onset of the trial, and 60-70 kg BW at the end of the trial. This is a comparable BW range as used previously at Wageningen University and Research institute, and well within the range of BW, maintaining healthy pigs and functional cannulas used in published literature. The use of growing pigs for this research is recommended by the FAO (2013).

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 pig is recommended by the FAO committee as a model for evaluating DIAAS scores of human foods. This choice is well documented in the FAO report (2013).

Reduction: in using a latin-square design, within pig variability can be separated from the variation between protein sources, hence minimizing the number of pigs to be used.

Refinement: after careful consideration, the length of the adaptation period, depending on the number of days the animal needs for adapting to new diets between experimental periods, was reduced from 12 to 5 days. In this way, every period within each trial lasts 7 days instead of 14 days, reducing the total duration of each trial from 12 to 6 weeks, which is often used for evaluating effects of fibrous diets. This decision fits within the procedures proposed by the FAO (2014), and is based on the notion that adaptation of small intestinal passage rates and digestive secretions to different protein sources is much quicker than the adaptation of the colon microbiota to changes in fibre sources. Although a straw bedding

is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs, in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained.

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The FAO recommendation for using the ileal cannulated pig as a model to estimate true digestibility of protein sources for humans is recent (2013, with a report on research methods released in 2014). The research proposed is part of a larger international effort () using the ileal cannulated pig as a model.

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.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental periods. The dimensions of the pens are 1.3 x 1.3m, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas of pen mates, but audio-visual contact will be possible. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements.

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.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Feeding a protein-free diet for a period of 7 days may increase breakdown of body proteins and concomitant feelings of discomfort.
- Prolonged individual housing.
- Fasting prior to the surgical procedure

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply:

- during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce faeces, indicating blockage of the intestines or inflammation of the peritoneum.
- a cannula is lost and it cannot be placed back into the distal ileum immediately.
- a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
- a pig has feed refusals exceeding 20% of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days.
- in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results.

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').

The level of discomfort is expected to be as listed below:

- Surgical procedure (including fasting): moderate
- Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (8 weeks): moderate
- Protein-free diet during 7 days: mild
- The sampling procedures (2 days during each of 6 subsequent weeks): mild

Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

No > 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'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	Production of ¹⁵ N-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing (¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄ into the rumen of a cow and production of ² H-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing ² H ₂ O into the rumen of a cow; subsequently collecting the milk and isolating the milk proteins

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This experiment will be executed to produce ¹⁵N-intrinsically-labelled milk protein and ²H-intrinsically-labelled milk protein. Two lactating cows will receive intraruminal infusions of (¹⁵NH₄)₂SO₄ and another two will receive intraruminal infusion of ²H₂O. The milk will be collected and processed voor consumption in the pig experiment (serial experiment 3).

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

Stable isotopes solutions will be infused into the rumen of lactating cows fitted with a rumen cannula for 7 days. Milk will be collected and processed. Cows have been previously equipped with a rumen cannula. It is estimated that for serial experiment 3, 175 L of both ¹⁵N and ²H enriched milk is needed.

Two cows will receive a continuous intraruminal infusion of 100 g of [REDACTED], to reach an isotopic enrichment of the protein of about [REDACTED]. After 3 days of infusion, ¹⁵N enriched milk will be collected for 4 consecutive days, and will be sent off for separation of the milk proteins.

Two cows will receive a continuous intraruminal infusion of [REDACTED], to reach an isotopic enrichment of the protein of about [REDACTED]. After 3 days of infusion, ²H enriched

milk will be collected for 4 consecutive days, and will be sent off for separation of milk protein, lactose and fat.

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

In line with the objective of this experiment, the number of cows required depends only on the amount of milk needed for conducting the experiment number 3, as further explained below. No statistical evaluation of the data is required.

B. The animals

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

4 Holstein Frisian dairy cows, previously fitted with a rumen cannula will be used. These fistulated cows are part of the dairy herd of [REDACTED], and will be selected for this experiment, based on the desired stage of lactation.

The number of cows needed is estimated from the amount of intrinsically labelled milk proteins needed for conducting experiment number 3. It is assumed the cows are in mid lactation, thus producing about 25 L/d, assuming an efficiency of conversion of [REDACTED]

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: Alternatives to produce the desired quantity of intrinsically labelled protein sources are not available.

Reduction: the amount of milk needed is calculated carefully to be enough, but not exceeding the amount of labelled milk required for the study.

Refinement: Cows are well adapted to handling procedures. Infusion procedures will be optimized allowing the cows to stand up or lie down without noticing the equipment.

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

The cows will be carefully transferred to the tie-stall, and infusion procedures will be conducted by experienced staff. Suffering is already minimal.

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.

This experiment is solely used to produce intrinsically labelled milk for other experiments.

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.

During the period of infusion, cows will be housed in a tie-stall barn to ensure they cannot move away from the infusion equipment. They can stand up and lie down in a normal way.

Animals will receive a grass-maize silage based roughage diet which meet their requirements. The amount of feed provided to individual animals will be adjusted according to the nutritional guidelines set by CVB standards and will be in line with the standard practice. Roughage will be available ad libitum and concentrates will be provided manually in three equal portions, given at 0600, 1400 and 2200h.

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?

Apart from housing the cows in a tie-stall barn, no adverse effects on animal welfare are expected

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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').

Housing in the tie-stall during the infusion procedure: mild.

Cumulative level of discomfort is therefore estimated as mild.

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.

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'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	3	To develop the isotope methodology in pigs, testing the main assumptions in pigs equipped with catheters in the portal and jugular veins.

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.

Measurement principle

The measurement is based on the principle that orally provided, labelled amino acids as well as intrinsically labelled proteins, when fed under steady state conditions, will appear in the systemic circulation and that its dilution is proportional to the quantity ingested. It then follows that, when ingesting a constant quantity of a ¹³C labelled amino acid source in time, and a variable quantity of a [redacted] of that particular amino acid ingested, hence independent of the dilution of each label by amino acid catabolism and influx into the circulation of amino acids from breakdown of body proteins. In this way, the ratio of labelled amino acids from intrinsically labelled protein sources and the ¹³C reference amino acid will reflect the true digestibility of the amino acids in the labelled protein source, provided that equal amounts of this protein source are ingested. When all assumptions underlying this methodology are verified, the application of this technique is simple and can be applied in humans using minimally invasive techniques, i.e. analysing the isotope ratio of amino acids in systemic blood following ingestion under steady state conditions.

Three assumptions need to be verified prior to the application of this method. Firstly, the assumption (**assumption 1**) that [redacted] ratio of amino acids in the blood is proportionally related to the quantity of [redacted] which are absorbed; Secondly, the assumption (**assumption 2**) that using protein bound amino acids ([redacted]) with a true digestibility near 100% (milk proteins) lead to a similar response under steady state conditions as a mixture of amino acids in free form [redacted]. Thirdly, the assumption (**assumption 3**) that amino acid metabolism (in intestinal wall or liver) does not change the ratio of [redacted] in amino acids.

Experimental design

The assumptions listed above will be tested in an experiment with pigs, equipped with catheters in the portal and jugular veins. The pigs will receive two discrete meals, divided in [REDACTED]

[REDACTED] Pigs will be allowed to adapt to the size of the meal for 7 days. The increase in the intake of labelled protein will lead to an increase in the ratio of labelled [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] labelled amino acids in the systemic circulation. It is hypothesized that this increase in the isotopic ratio quantitatively reflects the increase in amino acids absorbed. Assumption 1 will be tested by comparing the ratio of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in amino acids between the two meals; Assumption 2 will be tested by comparing the ratio of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in amino acids in portal blood. Assumption 3 will be tested by comparing the ratio of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in amino acids between diet, portal blood and jugular blood.

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

Four barrows of about 25 kg of BW + three spare pigs will be purchased. Six barrows will be surgically fitted with catheters in the portal and jugular veins. Based on previous experience, it is estimated that two spare pigs are needed to ensure catheter patency of at least 4 animals throughout the 16d experimental period. Should problems arise during or immediately after surgery, the third spare pig will be used the next day. This is needed as occasionally vein architecture does not allow placement of a catheter, and problems with catheter patency may occur immediately during recovery. Pigs will be fasted prior to the surgical procedure, which will be conducted under inhalation anaesthesia. During the day of surgery, the day preceding and three days following, antibiotics will be used to minimize infection risks. Adequate painkillers will be used during recovery. During 7 days post-surgery, pigs will be allowed to recover, and feed allowance will be gradually increased to a feeding level of 2.5 times their estimated maintenance energy requirements.

Pigs will receive each of both meals in a change-over design, with the sequence balanced across pigs. Isotope meals will be administered on days 9 and 16 post surgery. During the 7 days preceding the isotope meals, pigs will be adapted to the size of the meals, fed twice daily.

Throughout the 16 d period, pigs will be housed individually, to prevent them from disturbing catheters of other pigs, in metabolic cages on a plastic coated floor. To collect faeces quantitatively, plastic bags will be attached to the rear end of the pigs as described by Van Kleef et al. (1994). Clean urine will be quantitatively collected using funnels underneath the cage. Portal and peripheral blood will be collected during the test days via catheters.

Test meals

A test meal will contain [REDACTED]

Measurements

During the experiment, the following measurements will be conducted:

- Portal and peripheral blood samples are collected on the days of test meal provision (d9 and 16), 30 minutes before feeding the first portion and at 30 minute intervals during 4.5 hours (11 samples in total per catheter, 5 mL/timepoint). Isotopic enrichment of amino acids will be analysed ([REDACTED]) in samples collected from the portal and peripheral circulation. When steady state conditions are verified, the ratio [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] ratios in the amino acids within the meal, in the portal and peripheral blood sample are calculated to meet the objectives described above.

Faeces and urine are quantitatively collected during a 4 day period preceding the day of test meal provision. Faecal and urinary excretion of total N will be determined and samples will be stored for possible analysis of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in particular fractions.

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

The number of observations required for meeting the objectives of this trial was calculated using a power analysis in SAS, for two treatments in a change-over design, one sided testing, and assuming between animal variation as described by Ten Have et al (2011), detailed below.

B. The animals

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

Seven barrows of about 25 kg BW will be purchased. Male animals will be used to ease collection of faeces without contamination with urine. The type of pig matches the pigs used for the determination of DIAAS scores in experiment 1 and 4 of this application, and is chosen in line with FAO guidelines. The number of pigs required is minimized by using a change-over design, using the pigs as their own controls. The number of observations needed was calculated using a power analysis:

The number of observations required to determine the difference between meals was determined using proc power in SAS. Estimates of variance were obtained from Ten Have et al (2011) who measured the response in portal and arterial blood following two protein meals. Data from tryptophan were selected as this is an important amino acid. The difference in arterial tryptophan concentration was selected as a representative response parameter, as this will represent the dilution in enrichment in the proposed experiment. Ten Have et al measured a difference in arterial concentrations of about 20 $\mu\text{mol/L}$ following a contrast in tryptophan intake comparable to the anticipated difference between meals. The obtained standard deviation was 5, derived from a graph in this manuscript. The power analysis was conducted for detecting a difference of 20 $\mu\text{mol/L}$, one sided and at an alpha of 0.05 and a power of 0.8. The resulting number of observations required for each treatment is 4.

It is expected that applying $n=4$ in a change-over design (4 observations; 2 periods) is sufficient to detect a statistically significant difference; especially as the standard deviation of the ratio between isotopes within an amino acid is likely smaller than that of an arterial concentration of an amino acid. Unfortunately, estimates of variation in these parameters are not available.

Reference: Ten Have, GAM, Engelen, MPKJ, Soeters, PB, Deutz, NEP. 2012. Absence of post-prandial gut anabolism after intake of a low quality protein meal *Clinical Nutrition* 31 (2012) 273-282

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: As described in the FAO guidelines (2013), current in vitro methods are not adequate to estimate protein quality of human protein sources. The proposed method, validated against the proposed standard (DIAAS scores in pigs, see serial nr 4), is now first developed in pigs, but can be applied later using minimally invasive procedures, directly in humans, thus replacing the ileal cannulated pig as a model.

Reduction: A change over design is applied to minimize the number of pigs needed.

Refinement: The use of isotope ratio's within each amino acid makes this procedure independent of isotope dilution originating from amino acids from protein breakdown. Such measurements would involve the measurement of a number of extra parameters, for example and notably the portal blood flow, which is more variable and would require a higher number of animals for achieving reliable estimates of amino acid fluxes. Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained.

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Assessing protein quality has been identified as a critical question by international authorities (FAO, 2014). While accepting the need for DIAAS estimates of human foods using the pig as a model, the FAO (2014) identified an urgent need to develop techniques that can be adopted to assess protein quality (amino acid availability) in humans directly, using minimally invasive techniques. This method, proposed by [REDACTED]

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.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental period. The dimensions of the pens are 1.3 x 1.3m, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to catheters. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging catheters of pen mates. Plastic bags will be attached to the rear end of the pigs to allow quantitative collection of faeces and the collection of clean urine (funnels underneath the cage). The use of bedding material is avoided as this will prevent the collection of clean urine samples. Pens will be enriched with non-destructable toys in a weekly alternating scheme as playing material, according to procedures developed at Wageningen University.

Milk proteins and isotopically labelled sources will be provided on top of a normal, commercial feed, that will be supplied slightly restricted to ensure complete consumption. Feed will be provided at 2.5 times the energy requirements for maintenance, being close to 80% of the ad libitum intake. Water is supplied in a ratio of minimum 2.5:1 relative to the feed. In addition, water is available ad libitum through drinking nipples. The protein sources will be provided on top of the feed supply.

Prior to surgery, feed allowance will be reduced and feed will be withheld (fasting) to assure an empty digestive tract. Thereafter, feed allowance will be gradually increased

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The placement of portal and jugular catheters is conducted under inhalation anaesthesia. Animals will be treated with painkillers during recovery (at least 3 days) and with antibiotics. Animals are cared for according to a standard protocol and by skilled staff.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Apart from individual housing and the surgical procedures (fasting prior to and recovery after), no adverse effects on welfare is expected.

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply:

- during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce faeces, indicating blockage of the intestines or inflammation of the peritoneum.
- Upon losing catheter patency.
- a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
- a pig has feed refusals exceeding 20 % of the amount of feed offered for a period exceeding 4 days.
- in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% during the 16 day duration of the trial. The major portion of this 25% is expected to occur during the first two days following surgery. In addition, technical failure of catheters will lead to removal of the pig from the experiment, but is not likely to lead to discomfort for the pig.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below:

- Surgical procedure (including fasting): moderate
- Attaching faecal bags (16 days): mild
- Sampling procedures (16 days): mild
- Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (16 days): moderate

Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Yes, after the procedures. Prolonged housing of pigs with a portal catheter is undesirable from an animal welfare point of view. Moreover, the location of the tip of this catheter needs to be verified during autopsy. When it becomes apparent that catheter placement is impossible, the pig will be killed during anaesthesia.

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'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 4	Type of animal procedure Validation of the isotope method against the DIAAS score method using pigs equipped with ileal cannulas and a catheter in the jugular vein; testing four ² H labelled protein sources and a protein-free treatment in a 5x5 latin square design.

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.

Five pigs (and three spare pigs) will be fitted with a T cannula in the distal ileum and with a catheter in the jugular vein. After a recovery and adaptation period, each pig will be subjected to all of five experimental diets in 5 periods in a 5x5 latin square design. During each period, ileal effluents will be collected and blood samples collected. DIAAS scores will be calculated from amino acid analysis in the diet and in ileal digesta, using TiO₂ as the indigestible marker. One of the treatments will be the feeding of a protein-free diet. Protein losses at the terminal ileum are assumed to represent the net endogenous secretions. True amino acid digestibility will be measured using the isotope methodology (see serial nr 3). Protein sources will be selected based on a difference in the estimated ileal protein digestibility, and labelled with ²H.

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

Five growing barrows (+ three spare pigs), ± 25 kg BW will be fitted with a T cannula in the distal ileum, and with a catheter in the jugular vein under inhalation anaesthesia. Pigs will be fasted prior to the surgery and will be treated with adequate painkillers and antibiotics during recovery. Pigs will be allowed 14 days to recover from the surgery and to adapt to housing conditions. After recovery from surgery, ileal effluents will be collected from each pig during 5 subsequent measurement periods. Each period will consist of a 5 day adaptation period, followed by collection of ileal digesta during 12 hours on days 5 and 7. Ileal digesta will be pooled per pig over the experimental period and will be stored at -20°C pending

analysis. This approach is selected to allow within pig comparisons of all protein sources (latin-square design), minimizing the total duration of the trial, thereby the risk of cannula complications. This procedure has been proposed by the expert working group of the FAO (2014). On day 3, the measurement, the protein sources will be replaced by sources of identical botanical origin, but intrinsically labelled with ²H. Two meals, [REDACTED]

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

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

Consistent with the objectives of this experiment, statistical methods will focus on predicting DIAAS scores by true amino acid digestibility calculated using the isotope method. In this analysis the potential of the true digestibility estimated by the isotope method will be tested as predictor of the DIAAS score. The mean square prediction error will be calculated, and decomposed in 3 components: i) overall bias, ii) deviation of the slope from unity, iii) random error. Variation between and within protein sources will be separated.

B. The animals

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

For this trial, 8 growing barrows (\pm 25 kg BW) will be purchased. Male animals will be used to ease collection of faeces without contamination with urine. Barrows will be used as entire males will be difficult to handle at the end of the trials. Surgery will be performed on all pigs, applying procedures described above. Three pigs will be considered as spare animals, and will be used in the case of problems with digesta collections or catheter patency in the other animals. If pigs are replaced by spare pigs during the experiment, observations can be included in the statistical analyses, provided that these pigs have been used for at least two of the experimental periods. Should problems arise during the last period, the measurement period for the spare pig will be extended by one period. Pigs will be about 30 kg BW at the onset of the trial, and 50-60 kg BW at the end of the trial.

For determining reliable estimates for DIAAS scores, 6 observations per protein source are required (see serial nr 1). For the objective of this experiment, however, the minimum recommended number of observations for establishing reliable DIAAS scores will be used (i.e. 5, see FAO, 2014). The total number of observations available for the comparison of DIAAS scores and isotope based estimates is 25 (5 periods x 5 pigs=25 for each amino acid), as both variation between and within protein sources can be used. In addition, protein sources will be selected based on a large difference in expected DIAAS scores.

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 pig is recommended by the FAO committee as a model for evaluating DIAAS scores of human foods. This choice is well documented in the FAO report (2013).

Reduction: in using a latin-square design, within pig variability can be separated from the variation

between protein sources, hence minimizing the number of pigs to be used. The objective of this comparison is to establish a method that can be directly applied in humans, thus replacing the cannulated pig model.

Refinement: after careful consideration, the length of the adaptation period, depending on the number of days the animal needs for adapting to new diets between experimental periods, was reduced from 12 to 5 days. In this way, every period within each trial lasts 7 days instead of 14 days, reducing the total duration of each trial from 12 to 6 weeks, which is often used for evaluating effects of fibrous diets. This decision fits within the procedures proposed by the FAO (2014), and is based on the notion that adaptation of small intestinal passage rates and digestive secretions to different protein sources is much quicker than the adaptation of the colon microbiota to changes in fibre sources.

Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained.

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Assessing protein quality has been identified as a critical question by international authorities (FAO, 2013). While accepting the need for DIAAS estimates of human foods using the pig as a model, the FAO (2013) identified an urgent need to develop techniques that can be adopted to assess protein quality (amino acid availability) in humans directly, using minimally invasive techniques. This method, proposed by

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.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental periods. The dimensions of the pens are 1.3 x 1.3m, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas of pen mates. Audio-visual between pigs contact is maintained. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements, but cage enrichment will be available (see above)

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Surgical procedure will be performed under inhalation anaesthesia. After surgery, animals will be treated with pain killers (at least 3 days) and antibiotics.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Feeding a protein-free diet for a period of 7 days may increase breakdown of body proteins and concomitant feelings of discomfort.
- Prolonged individual housing.
- Fasting prior to the surgical procedure

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply:

- during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce faeces, indicating blockage of the intestines.
- upon losing catheter patency.
- a cannula is lost and it cannot be placed back into the distal ileum immediately.
- a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
- a pig has feed refusals exceeding 20 % of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% during the 7 week duration of the trial. The major portion of this 25% is expected to occur during the first two days following surgery. In addition, technical failure of cannulas or catheters will lead to removal of the pig from the experiment. If this leads to discomfort of the pig, it will be for a very short period of time.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below:

- Surgical procedure (including fasting): moderate
- Sampling procedures (6 weeks): mild
- Feeding of a protein-free diet (7 days): mild
- Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (8 weeks): moderate

Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

No > 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: AVD104002015326
2. Titel van het project: Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model
3. Titel van de NTS: Bepalen van de kwaliteit van eiwitbronnen voor humane voeding
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC Wageningen-UR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 05-11-2015
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 16-11-2015
Anderszins behandeld:
Termijnonderbreking(en) van 23-11-2015 tot 3-12-2015 en van 2-11-2015 tot 6-11-2015
Aanpassing aanvraag: 3-12-2015
Advies aan CCD: 11-12-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 16-11-2015
Strekking van de vragen:
M.b.t. het projectvoorstel:
 - Toelichting op de wijze van selecteren van de 28 eiwitten; voedergrondstoffen/planten?).M.b.t. de appendices (voor zover van toepassing)
 - Argumentatie voor het gebruik van 1 sexe (mannelijke dieren);
 - Argumentatie voor het gebruik van gecastreerde dieren;
 - Consistentie in gebruik van pijnstillers en antibiotica toedient bij vergelijkbare experimenten;
 - Toelichting op het aantal te opereren dieren en argumentatie m.b.t. het aantal geopereerde reservedieren; suggestie om reservedieren meteen mee te laten lopen in de proef);
 - Toelichting op de noodzaak van nog 1 extra dier (on geopereerd) in appendix 3 en op de behandelingen die dat dier ondergaat;
 - Tekstuele opmerking m.b.t. hergebruik in appendix 2;
 - Toevoegen van het vasten bij H. en K. en uitgebreidere beschrijving van de mogelijke maatregelen ter beperking van het ongerief;
 - Enkele redactionele opmerkingenM.b.t. de niet-technische samenvatting:
 - Toevoegen vaneen indicatie over de manier waarop het geplande experiment met mensen is gepland en de dierexperimenten van dit project op elkaar worden afgestemd (ook in het projectvoorstel)De antwoorden hebben geleid tot een adequate aanpassing van de aanvraag.
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC): n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het substantiële belang van het project wordt door de DEC onderschreven. De (toenemende) schaarste aan eiwitbronnen vergroot de noodzaak om een goed onderbouwde schatting te maken van de kwaliteit van eiwitten. Daarnaast is er behoefte aan de ontwikkeling van niet-invasieve en gemakkelijk uitvoerbare methoden voor het meten van eiwit- en aminozuurverteerbaarheid en de biobeschikbaarheid van verschillende eiwitbronnen.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project. Het gebruik van een ileale canule bij varkens wordt algemeen toegepast voor de evaluatie van de eiwitkwaliteit in varkensvoer en is door de onderzoeksgroep vaker toegepast. Ook is er ruime ervaring met het werken met (isotoop)gemerkte aminozuren in varkensstudies. Door samenwerking met andere instituten wordt ontbrekende expertise aangevuld.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheid op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: varkens worden tijdelijk individueel gehuisvest. Er wordt dan ook geen beddingmateriaal gebruikt. Dit wordt voldoende beargumenteerd en is noodzakelijk vanuit de doelstelling van de proef.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief realistisch is ingeschat en geclassificeerd: voor de varkens 'matig', alle drie de experimenten met varkens bevatten korte perioden met matig ongerief (operatie en herstel), gevolgd door een wat langere periode met matig ongerief als gevolg van individuele huisvesting; voor de koeien bestaat het uit het vaststaan tijdens de infusieperiode.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De beschikbare proefdiervrije technieken zijn niet geschikt om de kwaliteit van eiwitbronnen op een goede manier vast te stellen. Voordat de (isotopen)techniek kan worden toegepast bij mensen, moet zij worden ontwikkeld m.b.v. een diermodel. Op termijn maakt dit het gebruik van proefdieren overbodig.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Voor het bepalen van de eiwitkwaliteit van de eiwitbronnen worden de richtlijnen van de FAO gebruikt voor het vaststellen van het aantal benodigde varkens. Het aantal koeien dat nodig is, is berekend aan de hand van de hoeveelheid melk die nodig is voor de proeven met varkens waarin de isotopenmethode wordt ontwikkeld. Voor het ontwikkelen van de isotopenmethode is aan de hand van beschikbare informatie uit literatuur geschat hoeveel varkens nodig zijn.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Operaties zullen worden uitgevoerd onder algehele narcose. Tijdens de herstelperiode zal adequate pijnbestrijding worden toegepast. Tijdens het uitvoeren van de metingen zullen de dieren dagelijks een aantal keren gecontroleerd worden door gecertificeerde dierverzorgers. Indien wordt opgemerkt dat een dier lijdt of er sprake is van ongerief en dit niet is voorzien als onderdeel van het proefplan dan zal een dierenarts worden geraadpleegd. In overleg zal dan worden bepaald of het dier moet worden behandeld en/of uit de proef moet worden verwijderd. Dieren zullen worden voorzien van afleidingsmateriaal in de hokken en dit materiaal zal regelmatig worden vervangen om verveling tegen te gaan.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

D. Ethische afweging

De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. In dit project wordt de eiwitkwaliteit van 28 eiwitbronnen voor humane consumptie bepaald in experimenten met varkens. Daarnaast wordt een nieuwe methode ontwikkeld die gebruik maakt van stabiele isotopen. Deze methode wordt ontwikkeld en getest bij varkens maar is straks eenvoudig toe te passen in mensen. Als deze methode werkt, zijn op termijn experimenten met varkens voor dit doel niet meer nodig.

E. Advies

1. Advies aan de CCD: De DEC adviseert unaniem de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University

██████████
Akkermaalsbos 12
Postbus 59
6700 AB Wageningen

**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
AVD104002015326

Uw referentie

Bijlagen

Datum 21 januari 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████

Op 14 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model met aanvraagnummer AVD104002015326. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben :

Welke informatie nog nodig

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

In de bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.3 en 3.4.4.4 wordt het bepalen van het lichaamsgewicht van de dieren niet beschreven. In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u het belang van het inzetten van groeiende varkens volgens advies van de FAO, omdat groei ook een indicatie is voor eiwit kwaliteit. Na chirurgie lijkt ontwikkeling van het lichaamsgewicht een belangrijke welzijnsparameter, of gewichtsverlies een criterium voor toepassen van Humane eindpunten. Kunt u aangeven of u de dieren weegt gedurende het experiment en wanneer dit het geval is kunt u dan deze parameters opnemen in de bijlagen dierproeven?

Het is zeker de bedoeling om de varkens te wegen (wekelijks), ook om de voergift te kunnen bepalen. Was ik vergeten te vermelden – Sorry! Ik heb dit nu opgenomen in de bijlagen. Evt gewichtsverlies kan ook een criterium zijn voor het toepassen van een Humaan eindpunt, al verwacht ik dat voerweigeren hier geschikter voor zijn (want treden op voor het ontstaan van gewichtsverlies). Omdat we de varkens wekelijks wegen kan gewichtsverlies over een 7 daagse period het gevolg zijn van het tijdstip van wegen tov bv urineren. Dit kan leiden tot een verkeerde inschatting van gewichtsverlies als welzijnsparameter. Ik heb daarom gewichtsverlies over een 14 daagse periode in bijlagen 3.4.4.1, en 3.4.4.4 opgenomen als humaan eindpunt, maar niet in 3.4.4.3 omdat dat experiment te kort duurt.

In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u bij punt C. dat de dieren worden hergebruikt, u heeft hier niet de bijbehorende vraag beantwoord "Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure".

Kunt u deze vraag alsnog beantwoorden?

Ik begrijp dit niet goed, want bij punt C staat achter dit kopje de volgende tekst:

"The cows have been previously equipped with a rumen fistula. Re-use of the animals in this experiment is acceptable as the discomfort in previous experiments has not been considered severe, and after the last experiment, the cows have been in the normal dairy herd for a longer period of time. "

Ik heb deze tekst zo gelaten, maar hoor graag van u als er iets mis mee is.

In de NTS bij 3.1 beschrijft u de doelstellingen van het project. Hier beschrijft dat dit project wordt uitgevoerd in varkens. Hierdoor komt het noemen van de koeien in 3.3 voor de lezer onverwachts. Kunt u onder 3.1 de koeien opnemen in de NTS [Gedaan](#)

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

Datum

21 januari 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD104002015326



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



Centrale Commissie Dierproeven i.o.

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.zbo-ccd.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

ADV 104002015326

2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.

Project proposal 'Assessing dietary protein quality for humans using te pig as a model'

3 Ondertekening

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

Naam

Datum

Handtekening

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



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'. 10400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Wageningen University
- 1.3 Provide the title of the project. Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Not only protein quantity, but also protein quality is important in maintaining essential body functions. Therefore, assessing protein quality has been identified as a critical question by international authorities (FAO, 2013). Protein nutritional quality is related to the capacity of the different food sources of protein to achieve the different functions associated to the supply of nitrogen and amino acids in the body. The

nutritional efficiency of a protein can be determined from the extent to which dietary protein nitrogen is absorbed and retained by the organism and is able to balance daily nitrogen losses. The capacity to provide an adequate profile of bioavailable indispensable amino acid is considered as a limiting factor for protein quality.

For this purpose, an amino acid scoring approach was designed, considering the capacity of a protein source ingested at the level of the mean protein requirement derived from nitrogen balance (0.66 g/kg/d for human adults) to meet indispensable amino acid needs. A refinement of this approach, the Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score (PD-CAAS), is currently widely adopted, and corrects the content of each indispensable amino acid of the protein by the faecal digestibility of the protein in order to evaluate the bioavailable part of these amino acids in comparison to a reference amino acid profile.

The use of a single value for crude protein digestibility to correct the dietary amount of each individual amino acid for its digestibility is considered a short-coming, when there are practically important quantitative differences in digestibility between crude protein and individual dispensable and indispensable amino acids. A further inherent shortcoming of the PD-CAAS approach is that correction of digestibility is based on an estimate of crude protein digestibility determined over the total digestive tract (i.e. faecal digestibility). Thus, microbial metabolism and interconversions of nitrogenous compounds disturb the estimation of bioavailable amino acids. For protein as a whole, absorption of nitrogen over the whole digestive tract is an appropriate measure, as nitrogen absorbed in forms other than amino acids can contribute to the nitrogen economy. For the assessment of bioavailable amino acids, however, the FAO (2013), based on critical reviews of the literature, has recommended that protein quality assessment should be based on true ileal digestibility values of individual amino acids, rather than the overall (faecal) digestibility of protein. This method is referred to as the Digestible Indispensable Amino Acid Score (DIAAS). At the present time, there is a limited quantity of data on the ileal amino acid digestibility of foods as determined in humans. Where human data are lacking, the FAO (2013) recommends that true ileal amino acid digestibility values from the growing pig be used, being preferred over those obtained from the growing laboratory rat.

While accepting the need for DIAAS estimates of human foods using the ileal cannulated pig as a model, in the same report, the FAO (2013) identifies an urgent need to develop techniques that can be adopted to assess protein quality (amino acid availability) in humans directly, using minimally invasive techniques. In this way, future estimates for true ileal digestibility values would not require ileal cannulated pigs for the standard evaluation of protein quality, but could also be used in different human populations.

Reference:

Dietary protein quality evaluation in human nutrition. Report of an FAO Expert Consultation, FAO Food and Nutrition Paper 92, ISBN 978-92-5-107417-6, FAO 2013

3.2 Purpose

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

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?
- To provide reliable DIAAS for 28 protein sources for human nutrition using the ileal cannulated pig (as indicated by the FAO, 2013 and detailed by the FAO expert working group, 2014).
- To develop a meal/plasma signature dual stable isotope-based approach using intrinsic labelled proteins for the non-invasive evaluation of protein digestibility, amino acid bioavailability and protein nutritional quality for humans.

Reference:

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

Feasibility of the project:

The first objective is feasible. Although the use of ileal cannulated pigs as a model for evaluating protein quality in humans is new, it is commonly applied for evaluation of protein quality in pig nutrition. It has been applied previously at [REDACTED]. This project is part of a larger, international research effort in which a larger number of protein sources for humans are evaluated using

the pig model. Alignment of procedures is ensured, and inter laboratory comparison is foreseen. For a limited number of protein sources (10), comparison with human ileal amino acid digestibility values is planned, following the recommendations of the FAO (2013), using two methods. The first method uses humans with a normal gastrointestinal tract and uses naso-ileal intubation to sample digesta from the terminal ileum (Deglaire et al., 2009). This method will be [REDACTED] at [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

The second objective concerns the development of a methodology which is minimally invasive and can be applied in healthy humans. This method, proposed by [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] has not been performed before. The method will be developed by [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] The novelty of the method is not in the techniques applied, but in the combination of different isotope labels, simultaneously administered to subjects. Validation of the isotope method against the well-established DIAAS method is required before implementation in humans, and is part of this application. Testing the isotope method in humans is planned in 2016, but is outside the scope of this application.

3.3 Relevance

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

Both protein quantity and protein quality are of importance for maintaining body functions like, the immune system, muscle mass and growth. As protein resources for human consumption worldwide are limiting, protein quality is of increasing importance. As acknowledged by the FAO (2013), there is an immediate need to replace the old standards for assessing protein quality (PD-CAAS) by methods based on ileal disappearance of amino acids, using the pig as a model. In addition, for the somewhat longer term, there is a need to develop non-invasive and easy to implement approaches and methods for the measurement of protein and amino acid digestibility and bioavailability for different protein sources in different populations.

3.4 Research strategy

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

Within the present project, we plan to develop a novel, stable isotope based technique to measure protein quality in humans, at the same time building a database on DIAAS values for 28 protein sources for humans, using a well-established methodology based on pigs. The isotope method is also developed in pigs, and it is planned to test this later in humans (outside the scope of this application). A cross-validation between methods is included in the project.

Building the database on DIAAS values for 28 human food sources will be conducted in 6 subsequent experiments. Within each experiment, 5 food sources will be tested, and a measurement of net endogenous protein losses at the terminal ileum will be included. To this end, each experiment will be conducted as a 6x6 latin square design with 6 treatments tested in all of 6 pigs in 6 subsequent periods. The 6 treatments include 5 different human protein sources and a protein free treatment for the measurement of endogenous ileal protein losses. In total, this will provide data on 30 protein sources (6 x 5). True digestibility values will be calculated by difference, and provide results that can be compared with the isotope methodology. One of the protein sources will be included in three experiments, providing the possibility to test repeatability. In addition, as this is part of a larger, international program, inter-laboratory comparison of 10 protein sources is planned. The selection of the 28 protein sources will be based on their quantitative importance for protein supply in humans worldwide and on their contrast in estimated protein digestibility.

For the development of the isotope method (principle is described in the appendix), milk proteins will be labelled with ¹⁵N and ²H by intraruminal infusion of ¹⁵N labelled ammoniumsulfate and ²H labelled water.

Subsequently, milk will be collected and milk proteins isolated and dried. In addition to these intrinsically labelled protein sources, a universally labelled ^{13}C labelled amino acid source will be purchased (^{13}C spirulina hydrolysate, 99% enriched).

Subsequently, these intrinsically labelled protein sources will be used for the development of the isotope method. The principle of the method is based on the different dilution of labels and is further explained in the experimental protocols. Briefly, all three labels are orally provided with a normal meal to pigs in a frequently fed manner to simulate steady state conditions. Each pig will be provided with two subsequent meals. [REDACTED]

[REDACTED]. It is hypothesized that this increase in the isotopic ratio quantitatively reflects the increase in amino acids absorbed, and can therefore be also applied to measure differences in DIAAS scores, resulting from differences in protein digestibility.

In order to develop this methodology, three assumptions need to be verified prior to an independent validation against the DIAAS method:

- 1) Verify that the [REDACTED] ratio of amino acids in the blood is proportionally related to the quantity of ^2H -labelled amino acids which are absorbed.
- 2) Verify that protein bound amino acids ([REDACTED]) lead to a similar response under steady state conditions (i.e. in frequently fed pigs) than a mixture of amino acids in free form (^{13}C labelled, high enrichment, low dose).
- 3) Verify that amino acid metabolism in the intestinal wall or liver does not change the ratio of [REDACTED] in amino acids.

These assumptions will be tested in pigs that are equipped with catheters in the portal and jugular veins. Assumption 3 can be tested by comparison of the ratios of [REDACTED] in amino acids between the diet, portal and jugular blood plasma.

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

This project comprises two parts: a) building a database of DIAAS scores of 28 protein sources for humans, using the ileal cannulated pig as a model; this will be performed in 6 subsequent animal experiments. b) development of an isotope methodology to assess protein quality. This will require 3 subsequent animal experiments: 1) the production of intrinsically labelled [REDACTED] milk protein from cow's milk; 2) evaluation of the main assumptions listed above in an experiment with pigs equipped with catheters in portal and jugular veins; 3) comparison of the developed isotope methodology to determine the isotopic signature of a protein, assessment of protein digestibility with [REDACTED] tracer method in plasma compared with true ileal digestibility. This will be performed using ileal cannulated pigs (for measurement of DIAAS scores) that are equipped with a catheter in the jugular vein (isotope methodology).

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.

For a description see 3.4.2. Milestones include the database of DIAAS scores of 28 human protein sources developed in part a; and a developed isotope method (part b) that can be applied for assessing protein quality in humans by the simple measurement of [REDACTED] ratios in amino acids in plasma sampled from the peripheral circulation. This method will be tested in humans following procedures similar to the experiment in pigs (peripheral blood only). Although this experiment is outside the scope of this application, it will be conducted in close collaboration with the research in pigs, described in this application.

Building the database (part a) and the development of the isotope method (part b) can be conducted in parallel. Within part b, three phases can be distinguished, which follow the three experiments described in 3.4.2.

Should the results of phase 2 indicate that the assumptions are not valid, phase 3 will not be conducted.

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	6 subsequent pig trials, conducted in a 6x6 latin square (6 ileal cannulated pigs, 6

	periods) each measuring DIAAS scores of 5 human protein sources, and a protein-free treatment to measure net ileal endogenous losses.
2	Production of [REDACTED] milk protein by directly infusing ([REDACTED]) into the rumen of a cow and production of ² H-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing [REDACTED] into the rumen of a cow; subsequently collecting the milk and isolating the milk proteins.
3	To develop the isotope methodology in pigs, testing the main assumptions in pigs equipped with catheters in the portal and jugular veins.
4	Validation of the isotope method against the DIAAS score method using pigs equipped with ileal cannulas and a catheter in the jugular vein; testing four ² H labelled protein sources and a protein-free treatment in a 5x5 latin square design.
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	1	6 subsequent pig trials, conducted in a 6x6 latin square (6 ileal cannulated pigs, 6 periods) each measuring DIAAS scores of 5 human protein sources, and a protein-free treatment to measure net ileal endogenous losses. In the description below, 1 trial is explained

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.

Six pigs (and two spare pigs) will be fitted with a T cannula in the distal ileum. After a recovery and adaptation period, each pig will be subjected to all of six experimental diets in 6 periods in a 6x6 latin square design. During each period, ileal effluents will be collected. DIAAS scores will be calculated from amino acid analysis in the diet and in ileal digesta, using TiO₂ as the indigestible marker. Treatments will include five protein sources and a protein-free diet. Protein losses at the terminal ileum when feeding the protein-free diet are assumed to represent the net endogenous secretions.

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

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

This experiment is not designed to detect statistically significant differences between protein sources. It is designed to provide reliable estimates of DIAAS scores of the selected protein sources, building up a database. The number of observations planned is following the FAO guidelines (2014). Nonetheless, data will be analysed using a generalized linear mixed model. A normal distributed error and identity link will

be assumed for DIAAS scores, but these assumptions will be verified. Pigs within period will be considered the experimental unit. Protein source and period will be included as fixed effects, and pig as random effect to account for repeated observations within pigs. Although this approach is new for the estimation of true digestible amino acids protein sources for humans, it is commonly applied for evaluation of protein sources for pig nutrition, obtaining 5 or 6 observations for each protein source to be tested, and demonstrated to allow detection of significant difference of DIAAS scores of 2-3% between protein sources. One of the protein sources will be included in three trials, allowing estimation of repeatability. In addition, for 10 protein sources that are also tested in two other institutes, inter-laboratory comparisons will be performed.

B. The animals

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

In each of the 6 subsequent pig trials, 8 growing barrows (\pm 25 kg BW) will be purchased. Male animals will be used to ease collection of faeces without contamination with urine. Barrows will be used as entire males will be difficult to handle at the end of the trials. Surgery will be performed on all pigs, following procedures as included in [REDACTED]. Slight modifications with regard to the type of cannula and location will be made to ensure alignment of procedures with other institutes within the international consortium. Two pigs will be considered as spare animals, and will be used in the case of problems with digesta collections in the other animals. The number of spare pigs is based on previous experience, needed to ensure a complete set of 6 observations for each protein source. If pigs are replaced by spare pigs during the experiment, observations can be included in the statistical analyses, provided that these pigs have been used for at least two of the experimental periods. To this end, spare pigs will be treated as their peers, and randomly assigned to a dietary treatment during each period. In the event that observations from another pig cannot be used, the samples obtained from the spare pigs will be analyzed, provided that they are obtained at the desired experimental treatment. Pigs will be about 30 kg BW at the onset of the trial, and 60-70 kg BW at the end of the trial. This is a comparable BW range as used previously at Wageningen University and Research institute, and well within the range of BW, maintaining healthy pigs and functional cannulas used in published literature. The use of growing pigs for this research is recommended by the FAO (2013). Body weight will be determined upon arrival of the pigs, and after surgery weekly until the end of the last experimental period.

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 pig is recommended by the FAO committee as a model for evaluating DIAAS scores of human foods. This choice is well documented in the FAO report (2013).

Reduction: in using a latin-square design, within pig variability can be separated from the variation between protein sources, hence minimizing the number of pigs to be used.

Refinement: after careful consideration, the length of the adaptation period, depending on the number of days the animal needs for adapting to new diets between experimental periods, was reduced from 12 to 5 days. In this way, every period within each trial lasts 7 days instead of 14 days, reducing the total duration of each trial from 12 to 6 weeks, which is often used for evaluating effects of fibrous diets. This decision fits within the procedures proposed by the FAO (2014), and is based on the notion that adaptation of small intestinal passage rates and digestive secretions to different protein sources is much

quicker than the adaptation of the colon microbiota to changes in fibre sources. Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs, in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained.

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The FAO recommendation for using the ileal cannulated pig as a model to estimate true digestibility of protein sources for humans is recent (2013, with a report on research methods released in 2014). The research proposed is part of a larger international effort () using the ileal cannulated pig as a model.

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.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental periods. The dimensions of the pens are 1.3 x 1.3m, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas of pen mates, but audio-visual contact will be possible. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements.

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.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Feeding a protein-free diet for a period of 7 days may increase breakdown of body proteins and concomitant feelings of discomfort.
- Prolonged individual housing.
- Fasting prior to the surgical procedure

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply:

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

Indicate the likely incidence.

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

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below:

- Surgical procedure (including fasting): moderate
- Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (8 weeks): moderate
- Protein-free diet during 7 days: mild
- The sampling procedures (2 days during each of 6 subsequent weeks): mild

Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

No > 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'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number	Type of animal procedure
	2	Production of ¹⁵ N-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing (¹⁵ NH ₄) ₂ SO ₄ into the rumen of a cow and production of ² H-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing ² H ₂ O into the rumen of a cow; subsequently collecting the milk and isolating the milk proteins

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This experiment will be executed to produce ¹⁵N-intrinsically-labelled milk protein and ²H-intrinsically-labelled milk protein. Two lactating cows will receive intraruminal infusions of (¹⁵NH₄)₂SO₄ and another two will receive intraruminal infusion of ²H₂O. The milk will be collected and processed voor consumption in the pig experiment (serial experiment 3).

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

Stable isotopes solutions will be infused into the rumen of lactating cows fitted with a rumen cannula for 7 days. Milk will be collected and processed. Cows have been previously equipped with a rumen cannula. It is estimated that for serial experiment 3, 175 L of both ¹⁵N and ²H enriched milk is needed.

Two cows will receive a continuous intraruminal infusion of [REDACTED], to reach an isotopic enrichment of the protein of about [REDACTED]. After 3 days of infusion, ¹⁵N enriched milk will be collected for 4 consecutive days, and will be sent off for separation of the milk proteins.

Two cows will receive a continuous intraruminal infusion of [REDACTED], to reach an isotopic enrichment of the protein of about [REDACTED]. After 3 days of infusion, ²H enriched

milk will be collected for 4 consecutive days, and will be sent off for separation of milk protein, lactose and fat.

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

In line with the objective of this experiment, the number of cows required depends only on the amount of milk needed for conducting the experiment number 3, as further explained below. No statistical evaluation of the data is required.

B. The animals

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

4 Holstein Frisian dairy cows, previously fitted with a rumen cannula will be used. These fistulated cows are part of the dairy herd of [REDACTED] and will be selected for this experiment, based on the desired stage of lactation.

The number of cows needed is estimated from the amount of intrinsically labelled milk proteins needed for conducting experiment number 3. It is assumed the cows are in mid lactation, thus producing about 25 L/d, assuming an efficiency of conversion of [REDACTED]

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.

The cows have been previously equipped with a rumen fistula. Re-use of the animals in this experiment is acceptable as the discomfort in previous experiments has not been considered severe, and after the last experiment, the cows have been in the normal dairy herd for a longer period of time.

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: Alternatives to produce the desired quantity of intrinsically labelled protein sources are not available.

Reduction: the amount of milk needed is calculated carefully to be enough, but not exceeding the amount of labelled milk required for the study.

Refinement: Cows are well adapted to handling procedures. Infusion procedures will be optimized allowing the cows to stand up or lie down without noticing the equipment.

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

The cows will be carefully transferred to the tie-stall, and infusion procedures will be conducted by experienced staff. Suffering is already minimal.

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.

This experiment is solely used to produce intrinsically labelled milk for other experiments.

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.

During the period of infusion, cows will be housed in a tie-stall barn to ensure they cannot move away from the infusion equipment. They can stand up and lie down in a normal way.

Animals will receive a grass-maize silage based roughage diet which meet their requirements. The amount of feed provided to individual animals will be adjusted according to the nutritional guidelines set by CVB standards and will be in line with the standard practice. Roughage will be available ad libitum and concentrates will be provided manually in three equal portions, given at 0600, 1400 and 2200h.

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?

Apart from housing the cows in a tie-stall barn, no adverse effects on animal welfare are expected

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of

humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

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').

Housing in the tie-stall during the infusion procedure: mild.

Cumulative level of discomfort is therefore estimated as mild.

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.

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'. 10400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Wageningen University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 3 | To develop the isotope methodology in pigs, testing the main assumptions in pigs equipped with catheters in the portal and jugular veins. |
- 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.

Measurement principle

The measurement is based on the principle that orally provided, labelled amino acids as well as intrinsically labelled proteins, when fed under steady state conditions, will appear in the systemic circulation and that its dilution is proportional to the quantity ingested. It then follows that, when ingesting a constant quantity of a ^{13}C labelled amino acid source in time, and a variable quantity of a [REDACTED] of that particular amino acid ingested, hence independent of the dilution of each label by amino acid catabolism and influx into the circulation of amino acids from breakdown of body proteins. In this way, the ratio of labelled amino acids from intrinsically labelled protein sources and the ^{13}C reference amino acid will reflect the true digestibility of the amino acids in the labelled protein source, provided that equal amounts of this protein source are ingested. When all assumptions underlying this methodology are verified, the application of this technique is simple and can be applied in humans using minimally invasive techniques, i.e. analysing the isotope ratio of amino acids in systemic blood following ingestion under steady state conditions.

Three assumptions need to be verified prior to the application of this method. Firstly, the assumption (assumption 1) that [REDACTED] ratio of amino acids in the blood is proportionally related to the quantity of [REDACTED] which are absorbed; Secondly, the assumption (assumption 2) that using protein bound amino acids ([REDACTED]) with a true digestibility near 100% (milk proteins) lead to a similar response under steady state conditions as a mixture of amino acids in free form ([REDACTED]). Thirdly, the assumption (assumption 3) that amino acid metabolism (in intestinal wall or liver) does not change the ratio of [REDACTED] in amino acids.

Experimental design

The assumptions listed above will be tested in an experiment with pigs, equipped with catheters in the portal and jugular veins. The pigs will receive two discrete meals, divided in [REDACTED]

[REDACTED]. Pigs will be allowed to adapt to the size of the meal for 7 days. The increase in the intake of labelled protein will lead to an increase in the ratio of labelled [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] labelled amino acids in the systemic circulation. It is hypothesized that this increase in the isotopic ratio quantitatively reflects the increase in amino acids absorbed. Assumption 1 will be tested by comparing the ratio of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in amino acids between the two meals; Assumption 2 will be tested by comparing the ratio of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in amino acids in portal blood. Assumption 3 will be tested by comparing the ratio of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in amino acids between diet, portal blood and jugular blood.

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

Four barrows of about 25 kg of BW + three spare pigs will be purchased. Six barrows will be surgically fitted with catheters in the portal and jugular veins. Based on previous experience, it is estimated that two spare pigs are needed to ensure catheter patency of at least 4 animals throughout the 16d experimental period. Should problems arise during or immediately after surgery, the third spare pig will be used the next day. This is needed as occasionally vein architecture does not allow placement of a catheter, and problems with catheter patency may occur immediately during recovery. Pigs will be fasted prior to the surgical procedure, which will be conducted under inhalation anaesthesia. During the day of surgery, the day preceding and three days following, antibiotics will be used to minimize infection risks. Adequate painkillers will be used during recovery. During 7 days post-surgery, pigs will be allowed to recover, and feed allowance will be gradually increased to a feeding level of 2.5 times their estimated maintenance energy requirements.

Pigs will receive each of both meals in a change-over design, with the sequence balanced across pigs. Isotope meals will be administered on days 9 and 16 post surgery. During the 7 days preceding the isotope meals, pigs will be adapted to the size of the meals, fed twice daily. Body weight of the pigs will be determined upon arrival and weekly after surgery until the end of the experimental period.

Throughout the 16 d period, pigs will be housed individually, to prevent them from disturbing catheters of other pigs, in metabolic cages on a plastic coated floor. To collect faeces quantitatively, plastic bags will be attached to the rear end of the pigs as described by Van Kleef et al. (1994). Clean urine will be quantitatively collected using funnels underneath the cage. Portal and peripheral blood will be collected during the test days via catheters.

Test meals

A test meal will contain [REDACTED]

Measurements

During the experiment, the following measurements will be conducted:

- Portal and peripheral blood samples are collected on the days of test meal provision (d9 and 16), 30 minutes before feeding the first portion and at 30 minute intervals during 4.5 hours (11 samples in total per catheter, 5 mL/timepoint). Isotopic enrichment of amino acids will be analysed ([REDACTED]) in samples collected from the portal and peripheral circulation. When steady state conditions are verified, the ratio [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] ratios in the amino acids within the meal, in the portal and peripheral blood sample are calculated to meet the objectives described above.

Faeces and urine are quantitatively collected during a 4 day period preceding the day of test meal provision. Faecal and urinary excretion of total N will be determined and samples will be stored for possible analysis of [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] in particular fractions.

Describe which statistical methods have been used and which other considerations have been taken into

account to minimise the number of animals.

The number of observations required for meeting the objectives of this trial was calculated using a power analysis in SAS, for two treatments in a change-over design, one sided testing, and assuming between animal variation as described by Ten Have et al (2011), detailed below.

B. The animals

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

Seven barrows of about 25 kg BW will be purchased. Male animals will be used to ease collection of faeces without contamination with urine. The type of pig matches the pigs used for the determination of DIAAS scores in experiment 1 and 4 of this application, and is chosen in line with FAO guidelines. The number of pigs required is minimized by using a change-over design, using the pigs as their own controls. The number of observations needed was calculated using a power analysis:

The number of observations required to determine the difference between meals was determined using proc power in SAS. Estimates of variance were obtained from Ten Have et al (2011) who measured the response in portal and arterial blood following two protein meals. Data from tryptophan were selected as this is an important amino acid. The difference in arterial tryptophan concentration was selected as a representative response parameter, as this will represent the dilution in enrichment in the proposed experiment. Ten Have et al measured a difference in arterial concentrations of about 20 $\mu\text{mol/L}$ following a contrast in tryptophan intake comparable to the anticipated difference between meals. The obtained standard deviation was 5, derived from a graph in this manuscript. The power analysis was conducted for detecting a difference of 20 $\mu\text{mol/L}$, one sided and at an alpha of 0.05 and a power of 0.8. The resulting number of observations required for each treatment is 4.

It is expected that applying $n=4$ in a change-over design (4 observations; 2 periods) is sufficient to detect a statistically significant difference; especially as the standard deviation of the ratio between isotopes within an amino acid is likely smaller than that of an arterial concentration of an amino acid. Unfortunately, estimates of variation in these parameters are not available.

Reference: Ten Have, GAM, Engelen, MPKJ, Soeters, PB, Deutz, NEP. 2012. Absence of post-prandial gut anabolism after intake of a low quality protein meal *Clinical Nutrition* 31 (2012) 273-282

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: As described in the FAO guidelines (2013), current in vitro methods are not adequate to estimate protein quality of human protein sources. The proposed method, validated against the proposed standard (DIAAS scores in pigs, see serial nr 4), is now first developed in pigs, but can be applied later using minimally invasive procedures, directly in humans, thus replacing the ileal cannulated pig as a model.

Reduction: A change over design is applied to minimize the number of pigs needed.

Refinement: The use of isotope ratio's within each amino acid makes this procedure independent of isotope dilution originating from amino acids from protein breakdown. Such measurements would involve the measurement of a number of extra parameters, for example and notably the portal blood flow, which is more variable and would require a higher number of animals for achieving reliable estimates of amino acid fluxes. Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual

contact between pigs is maintained.

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Assessing protein quality has been identified as a critical question by international authorities (FAO, 2014). While accepting the need for DIAAS estimates of human foods using the pig as a model, the FAO (2014) identified an urgent need to develop techniques that can be adopted to assess protein quality (amino acid availability) in humans directly, using minimally invasive techniques. This method, proposed by [REDACTED]

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.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental period. The dimensions of the pens are 1.3 x 1.3m, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to catheters. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging catheters of pen mates. Plastic bags will be attached to the rear end of the pigs to allow quantitative collection of faeces and the collection of clean urine (funnels underneath the cage). The use of bedding material is avoided as this will prevent the collection of clean urine samples. Pens will be enriched with non-destructable toys in a weekly alternating scheme as playing material, according to procedures developed at Wageningen University.

Milk proteins and isotopically labelled sources will be provided on top of a normal, commercial feed, that will be supplied slightly restricted to ensure complete consumption. Feed will be provided at 2.5 times the energy requirements for maintenance, being close to 80% of the ad libitum intake. Water is supplied in a ratio of minimum 2.5:1 relative to the feed. In addition, water is available ad libitum through drinking nipples. The protein sources will be provided on top of the feed supply.

Prior to surgery, feed allowance will be reduced and feed will be withheld (fasting) to assure an empty digestive tract. Thereafter, feed allowance will be gradually increased

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The placement of portal and jugular catheters is conducted under inhalation anaesthesia. Animals will be treated with painkillers during recovery (at least 3 days) and with antibiotics. Animals are cared for according to a standard protocol and by skilled staff.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Apart from individual housing and the surgical procedures (fasting prior to and recovery after), no adverse effects on welfare is expected.

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply:

- during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce faeces, indicating blockage of the intestines or inflammation of the peritoneum.
- Upon losing catheter patency.
- a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
- a pig has feed refusals exceeding 20 % of the amount of feed offered for a period exceeding 4 days.
- in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a pig will not provide reliable results.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% during the 16 day duration of the trial. The major portion of this 25% is expected to occur during the first two days following surgery. In addition, technical failure of catheters will lead to removal of the pig from the experiment, but is not likely to lead to discomfort for the pig.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below:

- Surgical procedure (including fasting): moderate
- Attaching faecal bags (16 days): mild
- Sampling procedures (16 days): mild
- Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (16 days): moderate

Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Yes, after the procedures. Prolonged housing of pigs with a portal catheter is undesirable from an animal welfare point of view. Moreover, the location of the tip of this catheter needs to be verified during autopsy. When it becomes apparent that catheter placement is impossible, the pig will be killed during anaesthesia.

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'.	10400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 4	Type of animal procedure Validation of the isotope method against the DIAAS score method using pigs equipped with ileal cannulas and a catheter in the jugular vein; testing four ² H labelled protein sources and a protein-free treatment in a 5x5 latin square design.

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.

Five pigs (and three spare pigs) will be fitted with a T cannula in the distal ileum and with a catheter in the jugular vein. After a recovery and adaptation period, each pig will be subjected to all of five experimental diets in 5 periods in a 5x5 latin square design. During each period, ileal effluents will be collected and blood samples collected. DIAAS scores will be calculated from amino acid analysis in the diet and in ileal digesta, using TiO₂ as the indigestible marker. One of the treatments will be the feeding of a protein-free diet. Protein losses at the terminal ileum are assumed to represent the net endogenous secretions. True amino acid digestibility will be measured using the isotope methodology (see serial nr 3). Protein sources will be selected based on a difference in the estimated ileal protein digestibility, and labelled with ²H.

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

Five growing barrows (+ three spare pigs), ± 25 kg BW will be fitted with a T cannula in the distal ileum, and with a catheter in the jugular vein under inhalation anaesthesia. Pigs will be fasted prior to the surgery and will be treated with adequate painkillers and antibiotics during recovery. Pigs will be allowed 14 days to recover from the surgery and to adapt to housing conditions. After recovery from surgery, ileal effluents will be collected from each pig during 5 subsequent measurement periods. Each period will consist of a 5 day adaptation period, followed by collection of ileal digesta during 12 hours on days 5 and 7. Ileal digesta will be pooled per pig over the experimental period and will be stored at -20°C pending

analysis. This approach is selected to allow within pig comparisons of all protein sources (latin-square design), minimizing the total duration of the trial, thereby the risk of cannula complications. This procedure has been proposed by the expert working group of the FAO (2014). On day 3, the measurement, the protein sources will be replaced by sources of identical botanical origin, but intrinsically labelled with ²H. [REDACTED]

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

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

Consistent with the objectives of this experiment, statistical methods will focus on predicting DIAAS scores by true amino acid digestibility calculated using the isotope method. In this analysis the potential of the true digestibility estimated by the isotope method will be tested as predictor of the DIAAS score. The mean square prediction error will be calculated, and decomposed in 3 components: i) overall bias, ii) deviation of the slope from unity, iii) random error. Variation between and within protein sources will be separated.

B. The animals

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

For this trial, 8 growing barrows (\pm 25 kg BW) will be purchased. Male animals will be used to ease collection of faeces without contamination with urine. Barrows will be used as entire males will be difficult to handle at the end of the trials. Surgery will be performed on all pigs, applying procedures described above. Three pigs will be considered as spare animals, and will be used in the case of problems with digesta collections or catheter patency in the other animals. If pigs are replaced by spare pigs during the experiment, observations can be included in the statistical analyses, provided that these pigs have been used for at least two of the experimental periods. Should problems arise during the last period, the measurement period for the spare pig will be extended by one period. Pigs will be about 30 kg BW at the onset of the trial, and 50-60 kg BW at the end of the trial. Body weight will be determined upon arrival and after surgery weekly until the end of the last experimental period.

For determining reliable estimates for DIAAS scores, 6 observations per protein source are required (see serial nr 1). For the objective of this experiment, however, the minimum recommended number of observations for establishing reliable DIAAS scores will be used (i.e. 5, see FAO, 2014). The total number of observations available for the comparison of DIAAS scores and isotope based estimates is 25 (5 periods x 5 pigs=25 for each amino acid), as both variation between and within protein sources can be used. In addition, protein sources will be selected based on a large difference in expected DIAAS scores.

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 pig is recommended by the FAO committee as a model for evaluating DIAAS scores of human foods. This choice is well documented in the FAO report (2013).

Reduction: in using a latin-square design, within pig variability can be separated from the variation between protein sources, hence minimizing the number of pigs to be used. The objective of this comparison is to establish a method that can be directly applied in humans, thus replacing the cannulated pig model.

Refinement: after careful consideration, the length of the adaptation period, depending on the number of days the animal needs for adapting to new diets between experimental periods, was reduced from 12 to 5 days. In this way, every period within each trial lasts 7 days instead of 14 days, reducing the total duration of each trial from 12 to 6 weeks, which is often used for evaluating effects of fibrous diets. This decision fits within the procedures proposed by the FAO (2014), and is based on the notion that adaptation of small intestinal passage rates and digestive secretions to different protein sources is much quicker than the adaptation of the colon microbiota to changes in fibre sources.

Although a straw bedding is not possible because it influences the measurements, cage enrichment will be varied weekly. Various, non-destructible toys will be made available to the pigs in a weekly alternating schedule, following a protocol developed at Wageningen University. Audio-visual contact between pigs is maintained.

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

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

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Assessing protein quality has been identified as a critical question by international authorities (FAO, 2013). While accepting the need for DIAAS estimates of human foods using the pig as a model, the FAO (2013) identified an urgent need to develop techniques that can be adopted to assess protein quality (amino acid availability) in humans directly, using minimally invasive techniques. This method, proposed by

[REDACTED]

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.

Pigs will be housed individually in metabolism pens during the recovery phase and during the experimental periods. The dimensions of the pens are 1.3 x 1.3m, allowing the pigs to move around freely. Walls will be smooth (covered by plexiglass) to prevent damage to cannulas. Animals will be housed on a plastic coated floor. Individual housing is needed to prevent animals from damaging cannulas of pen mates. Audio-visual between pigs contact is maintained. The use of bedding material is avoided as this will be consumed by the pigs and will thus interfere with the digestibility measurements, but cage enrichment will be available (see above)

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Surgical procedure will be performed under inhalation anaesthesia. After surgery, animals will be treated with pain killers (at least 3 days) and antibiotics.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Feeding a protein-free diet for a period of 7 days may increase breakdown of body proteins and concomitant feelings of discomfort.
- Prolonged individual housing.
- Fasting prior to the surgical procedure

Explain why these effects may emerge.

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

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following humane endpoints will apply. Pigs will be euthanized should one of the following conditions apply:

- during the recovery from surgery, a pig does not start eating within 2 days, and subsequently produce faeces, indicating blockage of the intestines.
- upon losing catheter patency.
- a cannula is lost and it cannot be placed back into the distal ileum immediately.
- a pig has a fever during 5 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
- a pig has feed refusals exceeding 20 % of the amount of feed offered for a period exceeding 7 days.
- a pig shows body weight loss in a 14d period.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of pigs to be removed from the experiment is estimated at 25% during the 7 week duration of the trial. The major portion of this 25% is expected to occur during the first two days following surgery. In addition, technical failure of cannulas or catheters will lead to removal of the pig from the experiment. If this leads to discomfort of the pig, it will be for a very short period of time.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below:

- Surgical procedure (including fasting): moderate
- Sampling procedures (6 weeks): mild
- Feeding of a protein-free diet (7 days): mild
- Individual housing in absence of bedding material, in a large metabolism pen (8 weeks): moderate

Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

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

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

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

Yes

Van: [REDACTED]
Verzonden: woensdag 3 februari 2016 9:03
Aan: Vergunningenloket
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vragen bij AVD104002015326

Beste [REDACTED]

Hierbij mijn reactie op onderstaande vraag:

Het protocol zoals gepubliceerd door de FAO schrijft voor dat elke proefdier zijn eigen eiwitvrije controle dient te hebben. De reden daarvoor is dat van al het eiwit dat de dikke darm instroomt, afhankelijk van de verstrekte eiwitbron, globaal tussen de 50 en 100% van endogene oorsprong is (mucus, epitheelcellen, microbiele biomassa, enzymen). Het is kwantitatief daarom nogal een belangrijke eiwitstroom, waar ook tussen-dier variatie op zit. Ik zie daarom geen mogelijkheden om uitkomsten voor de schatting van endogene eiwitverliezen van dieren of groepen te combineren zonder verlies van precisie van de schatting van de ware eiwitverteerbaarheid van eiwitbronnen.

Als er nog vragen zijn dan hoor ik het graag,

Vriendelijke groet,

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: dinsdag 2 februari 2016 9:26
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vragen bij AVD104002015326

Geachte [REDACTED]

U heeft een aanvraag voor projectvergunning ingediend bij de CCD. Het gaat om het project AVD104002015326 getiteld: Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model. De CCD heeft uw aanvraag besproken. U heeft al een aantal vragen beantwoord, hartelijk dank hiervoor, in aanvulling hierop heeft de CCD nog een vraag over het inzetten van de groepen met eiwitvrij dieet. Is het noodzakelijk om in elke proefgroep een dergelijke controle groep in te zetten of zijn er mogelijkheden om uitkomsten van deze groep te combineren.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University

Postbus 59
6700 AW WAGENINGEN

**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
AVD104002015326

Uw referentie

Datum **09 FEB. 2016**
Betreft **Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven**

Bijlagen
1

Geachte [REDACTED]

Op 14 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model" met aanvraagnummer AVD104002015326. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 januari 2016 hebben wij u nog een aantal vragen gesteld om aanvullende informatie. U heeft deze op 21 januari 2016 beantwoord en naar aanleiding van deze aanvullende informatie de documenten van uw aanvraag aangepast. Op 2 februari 2016 hebben wij u nogmaals een vraag gesteld, deze heeft u op 9 februari 2016 voldoende beantwoord. Dit antwoord heeft niet tot aanpassing van de documenten geleid.

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 "Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 2016 tot 1 maart 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-WUR gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 december 2015. Op 21 januari 2016 hebben wij de DEC een vraag gesteld, deze vraag is door de DEC beantwoord op 21 januari 2016. 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. Om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10a. van de wet worden aan meerjarige projecten twee algemene voorwaarden gesteld. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum
9 februari 2016
Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002015326

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.

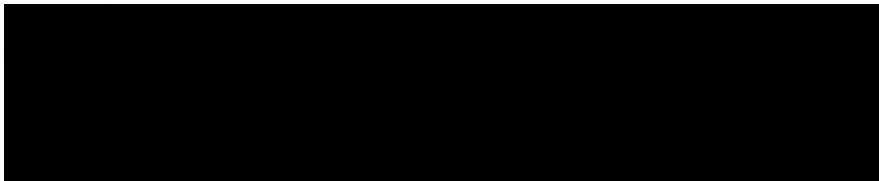
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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: Wageningen universiteit
Adres: Postbus 59
Postcode en woonplaats: 6700 AW WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2016 tot 1 maart 2020, voor het project "Assessing dietary protein quality for humans using the pig as a model" met aanvraagnummer AVD104002015326, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WUR.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 december 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 januari 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 21 januari 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 11 december 2015, ontvangen op 14 december 2015;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 21 januari 2016 en 9 februari 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Bijlage 3.4.4.1 6 subsequent pig trials, conducted in a 6x6 latin square (6 ileal cannulated pigs, 6 periods) each measuring DIAAS scores of 5 human protein sources, and a protein-free treatment to measure net ileal endogenous losses. In the description below, 1 trial is explained	Varkens (Sus scrofa domesticus) / barrows 25 kg	48	Matig
Bijlage 3.4.4.2 Production of 15N-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing (15NH4)2SO4 into the rumen of a cow and production of 2H-intrinsically-labelled milk protein by directly infusing 2H2O into the rumen of a cow; subsequently collecting the milk and isolating the milk proteins	Runderen (Bos taurus) / Holstein Frisian Pensfistel koeien	4	Licht
Bijlage 3.4.4.3 To develop the isotope methodology in pigs, testing the main assumptions in pigs equipped with catheters in the portal and jugular veins.	Varkens (Sus scrofa domesticus) / barrows 25 kg	7	Matig
Bijlage 3.4.4.4 Validation of the isotope method against the DIAAS score method using pigs equipped with ileal cannulas and a catheter in the jugular vein; testing four 2H labelled protein sources and a protein-free treatment in a 5x5 latin square design.	Varkens (Sus scrofa domesticus) / barrows 25 kg	8	Matig

Datum

9 februari 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD104002015326**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 beslissingen 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 melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdoving

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

Einde van een dierproef

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

zal blijven 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 W16-09S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015327								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

27 NOV 2015



AVD 103002015327

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	Instantie voor Dierenwelzijn
		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 Grooteplein 10
		Postbus	9101, [redacted]
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl	

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

<input checked="" type="checkbox"/> Ja	> Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging 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 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	2 5 . 1 2 . 2 0 1 5
Einddatum	2 5 . 1 2 . 2 0 2 0

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Neural correlates of post-traumatic stress disorder: natural resilience as key for intervention.

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

Onderzoek naar de hersenkenmerken die beschermen tegen post-traumatische stress stoornis.

- 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.
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

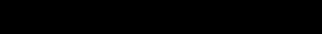
6 Ondertekening

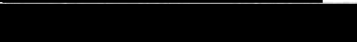
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

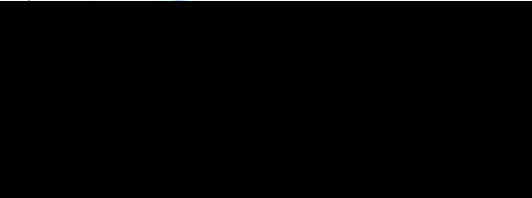
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 

Plaats Nijmegen

Datum 25 - 11 - 2015

Handtekening 



**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.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'.	10300
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3 Provide the title of the project.	Neural correlates of post-traumatic stress disorder: [REDACTED]

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 or 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.

Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a debilitating disease which typically develops after a person is exposed to a traumatic event. It is characterized by a variety of symptoms such as flashbacks, hyperarousal, and insomnia, which severely deteriorate quality of life (1,2). Current estimates are that PTSD affects ~8% of the population (3), but numbers seem to be increasing rapidly (4). A variety of medications is currently used to 'treat' PTSD, but since the neural basis of PTSD is still largely unknown, treatments are symptomatic, only effective for fewer than half the patients (5), and side effects and residual symptoms following treatment are rule rather than exception.

Although substantial effort has been put into the elucidation of PTSD pathophysiology (6), successes have been limited due to the enormous heterogeneity of typical patient cohorts, caused by differences in genetic and environmental factors, trauma exposure, medication use (7), and comorbidity (8). Moreover, data from patients is generally obtained *following* the diagnosis of PTSD, making it practically impossible to determine whether the observed differences between psychiatric patients and healthy controls are related to respective causes (i.e., vulnerability) or consequences (i.e., symptoms) of PTSD. Delineation of these factors would advance diagnosis of the disorder and treatment of the correct symptoms, preventing escalation. Furthermore, one is clearly limited in the methods of studying the human brain, as invasive measures are highly undesirable.

Recent neuroscientific findings have indicated that the brain is organized as a set of functional networks (9), which are often reciprocally connected and represent unique brain functions. Imbalance in the activity and connectivity of these networks has been proposed to underlie complex mental disorders such as PTSD (10-15). We hypothesize that PTSD may result from a *chronic imbalance in neural network function* in terms of activity and connectivity (either present at baseline, occurring in response to trauma exposure, or during recovery) in which emotional (i.e., salience) processing overrules cognitive function. However, the exact mechanistic underpinnings of this chronic imbalance in neural network function and when it exactly occurs during PTSD development, is currently unclear. This disturbed neural network balance could either be present (to a certain extent) during baseline, i.e., before any trauma exposure has happened (Figure 1, scenario 1), develop upon trauma exposure (Figure 1, scenario 2), or following (inadequate) recovery of the traumatic experience (Figure 1, scenario 3). It is important to distinguish these scenario's, since each of them would have different practical implications for health care. Identification of individuals at risk even before trauma-exposure (scenario 1) might argue against their fitness for highly stressful occupations, or for their immediate treatment when trauma-exposure has occurred, and thereby contribute to the prevention of PTSD. The identification of markers for abnormal response to the trauma (scenario 2) would allow for the close monitoring and

identification of the pathology-related neural changes in trauma-exposed individuals, opening the opportunity for early diagnosis and intervention. Lastly, characterization of the pathology-related changes (scenario 3) could be used as marker for diagnosis in a later stage of PTSD, reducing the frequency of misdiagnoses and providing a lead for new treatment options.

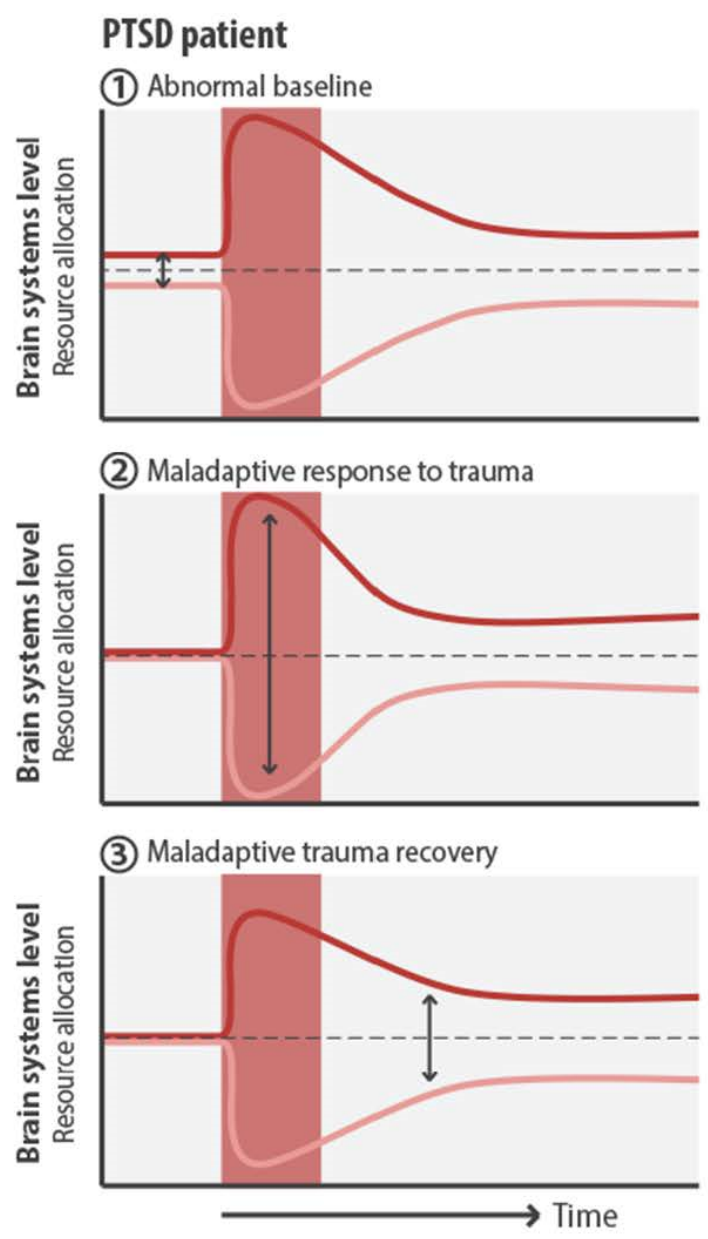
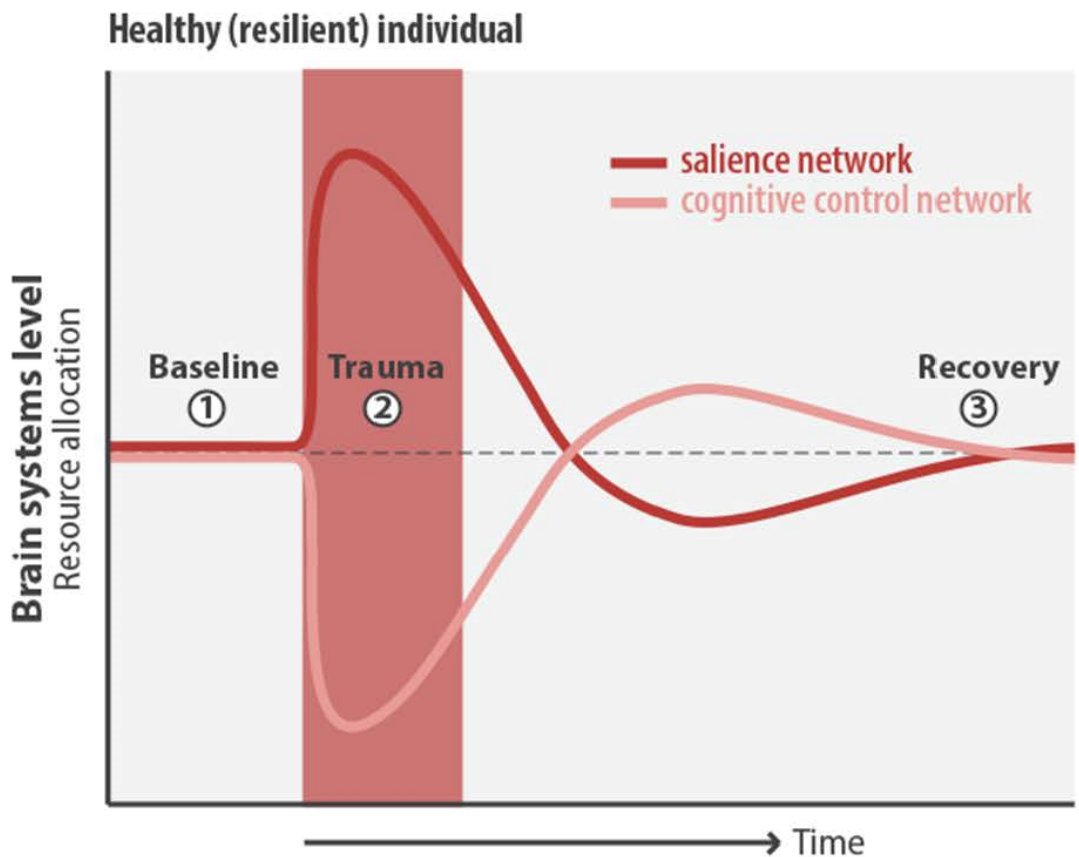


Figure 1. Hypothesized reallocation of neural resources of the salience (emotion) and cognitive control network upon trauma exposure in the healthy and PTSD brain (adapted from 16). We propose to investigate the abnormalities in neural network function at baseline (scenario 1), upon trauma exposure (scenario 2), and following recovery (scenario 3).

Although translational value has to be warranted, animal studies provide the clear advantage of more invasive sampling techniques and methods for intervention, while allowing for tightly controlled prospective studies. Here, I propose to use a previously validated mouse model for PTSD-induction (17-19, see also Ru-DEC 2014-175 & Ru-DEC 2014-243), in which mice are exposed to a severe stressor (i.e., intense electric footshock). This protocol, has been shown to reliably induce PTSD-like symptomatology - i.e., hypervigilance, insomnia, compulsivity, and impaired attention and risk assessment (2) -

Here, we aim to elucidate the microscopic neuronal circuit function differentiating the PTSD-vulnerable from brain to enhance the understanding of PTSD etiology to improve its detection and treatment. We will do so in three steps. First, we will identify and characterize the neuronal subpopulations that show differential activity or plasticity in PTSD-mice. Next, we will identify the neuronal circuits they are part of (and by which they establish their effects). Last, we will manipulate the activity (or plasticity) of these neuronal circuits and deliver causal evidence for the observed network changes and the PTSD-like phenotype. As it is important to determine when the neuronal network changes arise, we will address each of these steps of identifying aberrant neuronal network function at baseline (research question #1), during trauma exposure (research question #2), or following trauma recovery (research question #3).

NB. As will become evident in the rest of the proposal, we will only use male mice for the proposed studies. We acknowledge the sex difference in sensitivity to PTSD, and think future dedicated studies should most certainly address this. Here we however chose to restrict ourselves to the sex with the most robust and stable stress response, in which the proposed PTSD model has been established (this is not the case for females). Since stress sensitivity is dependent on the hormonal cycle of females (25,26), as is the brain response to stress (25), testing of females would require three times the amount of animals and close monitoring of their estrous cycle.

References

1. American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. p. 271–280.
2. American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV*. Washington, DC: American Psychiatric Association.
3. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Walters EE (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of twelve-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Archives of General Psychiatry* 62(6): 617-627.
4. Institute of Medicine of the national academies (2014). *Treatment for Posttraumatic Stress Disorder in Military and Veteran Populations: Final Assessment*.
5. Maxmen JS, Ward NG (2002). *Psychotropic drugs: fast facts* (3rd ed.). New York: W. W. Norton. p. 346.
6. Krystal JH, Neumeister A, Alexander, Neumeister (2009). Noradrenergic and serotonergic mechanisms in the neurobiology of posttraumatic stress disorder and resilience. *Brain Research* 1293: 13–23.
7. Lanius RA, Brewin CR, Bremner JD, Daniels JK, Friedman MJ, Liberzon I, et al (2010). Does neuroimaging research examining the pathophysiology of posttraumatic stress disorder require medication-free patients? *J Psychiatry Neurosci* 35(2): 80-89.
8. Vieweg WV, Julius DA, Fernandez A, Beatty-Brooks M, Hettema JM, Pandurangi AK (2006). Posttraumatic stress disorder: clinical features, pathophysiology, and treatment. *Am J Med* 119(5): 383-390.
9. Beckmann CF, DeLuca M, Devlin JT, Smith SM (2005). Investigations into resting-state connectivity using independent component analysis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360: 1001-1013.
10. Whitfield-Gabrieli S, Ford JM (2012). Default mode network activity and connectivity in psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol* 8: 49-76.
11. Admon R, Leykin D, Lubin G, Engert V, Andrews J, Pruessner J, Hendler T (2013). Stress-induced reduction in hippocampal volume and connectivity with the ventromedial prefrontal cortex are related to maladaptive responses to stressful military service. *Hum Brain Mapp* 34(11): 2808-2816.
12. Patel R, Spreng RN, Shin LM, Girard TA (2012). Neurocircuitry models of posttraumatic stress disorder and beyond: a meta-analysis of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 36(9): 2130-2142.
13. Sripada RK, King AP, Welsh RC, Garfinkel SN, Wang X, Sripada CS, Liberzon I (2012). Neural dysregulation in posttraumatic stress disorder: evidence for disrupted equilibrium between salience and default mode brain networks. *Psychosom Med* 74(9): 904-911.
14. Lanius RA, Bluhm RL, Coupland NJ, Hegadoren KM, Rowe B, Théberge J, Neufeld RW, Williamson PC, Brimson M (2010). Default mode network connectivity as a predictor of post-traumatic stress disorder symptom severity in acutely traumatized subjects. *Acta Psychiatr Scand* 121(1): 33-40.
15. Daniels JK, McFarlane AC, Bluhm RL, Moores KA, Clark CR, Shaw ME, Williamson PC, Densmore M, Lanius RA (2010). Switching between executive and default mode networks in posttraumatic stress disorder: alterations in functional connectivity. *J Psychiatry Neurosci* 35(4): 258-266.
16. [REDACTED]
17. [REDACTED]
18. [REDACTED]

19. [REDACTED]
20. Rau V, DeCola JP, Fanselow MS (2005). Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 1207–1223.
21. Dykman RA, Ackerman PT, Newton JE (1997). Posttraumatic stress disorder: a sensitization reaction. *Integr Physiol Behav Sci* 32(1): 9-18.
22. Jovanovic T, Kazama A, Bachevalier J, Davis M (2012). Impaired safety signal learning may be a biomarker of PTSD. *Neuropharmacology* 62(2): 695-704.
23. Yehuda R, Antelman SM (1993). Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biol Psychiatry* 33(7): 479-486.
24. Liberzon I, Krstov M, Young EA (1997). Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 22(6): 443-453.
25. Ossewaarde L, Hermans EJ, van Wingen GA, Kooijman SC, Johansson IM, Bäckström T, Fernández G (2010). Neural mechanisms underlying changes in stress-sensitivity across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology* 35(1): 47-55.
26. Lustyk MK, Douglas HA, Shilling EA, Woods NF (2012). Hemodynamic and psychological responses to laboratory stressors in women: assessing the roles of menstrual cycle phase, premenstrual symptomatology, and sleep characteristics. *Int J Psychophysiol* 86(3): 283-290.

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 objective* of this project is to elucidate aberrant neuronal circuit function differentiating the PTSD-[REDACTED] brain to enhance the understanding of PTSD etiology.

The following 3 *research questions* will be addressed to meet our objective:

1. Which neuronal circuit function at baseline is predictive of PTSD-development?
2. Which neuronal circuit response to trauma exposure predicts PTSD-development?
3. Which neuronal circuit function is associated with PTSD-pathology and resiliency following trauma recovery?

Feasibility

This research project [REDACTED]

We have the experience and facilities in-house to perform the required studies. Researchers involved in this proposal have extensive experience with the proposed PTSD model, as well as the use of the proposed techniques (qPCR, immunohistochemistry, neuronal tracing, and optogenetics) for the experiments. Moreover, in collaboration with others, the researchers have already performed (successful) preliminary tests in the proposed transgenic mouse lines. The use of an available light-sheet microscope will further facilitate the analyses of fluorescent labeling.

3.3 Relevance

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

Estimates are that up to 90% of all people will be exposed to a severe traumatic event during their life time, of which a substantial part (15-20%) ultimately develops PTSD (1). This makes PTSD the fourth most common psychiatric diagnosis, which annually affects 7.7 million adults in Europe only (2). Patients typically experience severe re-experiencing symptoms of the traumatic event, which can manifest themselves as flashbacks, nightmares, or frightening thoughts. Moreover, they often show emotionally numbing, feel strong guilt, depression, or worry and loose interest in activities that were enjoyable in the past. They are also characterized by a state of hyperarousal; they are easily startled, feel tense "on edge", often have difficulty sleeping, and have angry outbursts. Thereby, patients feel stressed or tensed continuously, and are often unable to do simple daily tasks, such as sleeping, eating, or concentrating.

Besides severely affecting one's quality of life, PTSD, and anxiety disorders in general, form a major financial burden on society. The annual cost to society of anxiety disorders is estimated to be significantly over €9 billion in Europe only, often due to misdiagnosis and under treatment (2). This includes psychiatric and non-psychiatric medical treatment costs, indirect workplace costs, mortality costs, and prescription drug costs. Up to date, there is no good medication to treat PTSD and other fear-related disorders. Although there are several existing pharmacological treatments, all of these rely on empirically derived approaches. The first-line medication approach for all anxiety disorders includes the antidepressant and anxiolytic classes of selective and non-selective serotonin and other monoamine reuptake inhibitors. It is clear these are not specific in their actions, they can have difficult side effects, and they are only effective in some cases. The second most-common class of agents to treat these disorders are the benzodiazepines, which act through enhancement of GABA activity, which have been shown successful in diminishing fear responses, but have the same limitations as the monoaminergic anxiolytics, in addition to having abuse and tolerance potential. Increasing our understanding of the neurobiological basis of PTSD can provide us with new leads for drug treatment.

Therefore, it is of major importance to society that PTSD is identified in an earlier phase, and that treatment efficacy improves. This goal can only be achieved when our understanding of the underlying neuronal basis of the disorder is increased. The experiments described in this protocol are expected to significantly contribute to exactly this. Answering research question #1 will enable us to identify vulnerability factors that characterize the brain at risk for PTSD even prior to trauma exposure. Answering experimental question #2 will inform us on the mechanistic underpinnings of both the adequate and inadequate response to trauma exposure, and answering experimental question #3 will inform us on the pathology indicative of the PTSD-like brain. If these findings can be translated to suitable biomarkers in humans (e.g., by taking blood samples for stress hormone (corticosterone) measurement, fMRI recordings to assess regional brain activity or plasticity, or genetic analyses indicative of protein levels), they could contribute to PTSD prevention and early diagnosis of those at risk, and new potential targets for intervention/treatment, creating new leads for the development of PTSD-specific medication. Furthermore, the obtained insights could contribute to a better understanding of stress-related and anxiety disorders in general, such as major depression and general anxiety disorder.

References

1. Santiago PN, Ursano RJ, Gray CL, Pynoos RS, Spiegel D, Lewis-Fernandez R, Friedman MJ, Fullerton CS (2013). A systematic review of PTSD prevalence and trajectories in DSM-5 defined trauma exposed populations: intentional and non-intentional traumatic events. *PLoS One* 8(4): e59236.
2. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jönsson B (2012). The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurology* 19: 155-162.

3.4 Research Strategy

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

The *overall objective* of this project is to elucidate aberrant neuronal circuit function differentiating the PTSD- [REDACTED] brain to enhance the understanding of PTSD etiology to improve its detection and treatment.

The following **3 related, though conceptually independent**, research questions will be addressed to meet our objective:

- 1) Which neuronal circuit function *at baseline* is predictive of PTSD-development?
- 2) Which neuronal circuit *response to trauma exposure* predicts PTSD-development?
- 3) Which neuronal circuit function is associated with PTSD-pathology and resiliency *following trauma recovery*?

Since it is critical in this proposal that the mice are behaviorally categorized as [REDACTED] of PTSD-like at the end of the paradigm (and thus survive until this final stage), this project requires tools to look into neuronal activity and plasticity retrospectively. That is, we need a technique to label neuronal activity and plasticity at a certain stage (at baseline, during trauma, following recovery) and link this to behavioral outcome of the PTSD-induction procedure in the end. Recently, two transgenic mouse strains have been developed that enable us to do so; [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]. Here, we will use these mice to study the PTSD- [REDACTED] brain at different stages throughout PTSD-development.

Since we will start by assessing neuronal activation during periods of relative rest in case of research question #1 & #3, compared to a period of exposure to a defined stimulus in case of research question #2, tackling these research questions asks for a somewhat different approach.

For research questions #1 & #3 our approach is as follows:

- A) First, we will determine the neuronal activation patterns dissociating the PTSD- [REDACTED] brain using indelible labeling of neuronal activation (with a fluorescent marker) in two specific transgenic mouse lines at either baseline (#1) or following recovery (#3). Next, once the neuronal populations displaying aberrant activation associated with PTSD-outcome have been identified, we will characterize them in terms of neurobiological make up using **quantitative PCR (qPCR), followed up by *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments to determine the specificity of the obtained results.**
 - B) Then, we will perform neuronal tracing studies on the identified neuronal subpopulation to determine their projection sites and identify the neural circuit affected.
 - C) Lastly, we will manipulate the activity and connectivity of this neuronal circuit to prevent (# 1) or treat (# 3) the PTSD phenotype respectively.
- For research question #2 our approach will be slightly different:
- A1) First, we start by identifying which brain regions actively respond to the entire PTSD-induction procedure ([REDACTED]) and test for any differences between PTSD- [REDACTED] animals. To be able to identify stress responsive brain regions at this stage, we will also include a control group (for each transgenic strain), which will not be exposed to the PTSD-induction procedure, but will be exposed to all other

treatments (e.g., [redacted]). This first experiment will mainly serve as a proof of principle (testing whether we can observe differential labeling (activity/plasticity) patterns in stress-related brain regions [redacted]), and will provide us with regions-of-interest for further investigation.

A2) Next, we will try to narrow down the time window of aberrant neuronal activation by looking into [redacted]-induced neuronal activation specifically ([redacted]), providing us with more detailed (and sensitive) information on the required activation patterns for PTSD-development.

[redacted] Again, a control group will be included here as well. The neuronal populations will be compared and characterized in terms of neurobiological make up using **quantitative PCR (qPCR), followed up by *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments to determine the specificity of the obtained results.**

B) Then, we will perform neuronal tracing studies on the most promising neuronal population (of A1 and A2) to determine its projection sites and identify the neural circuits affected.

C) Finally, we will manipulate the activity and connectivity of this neuronal circuit to intervene with PTSD-development.

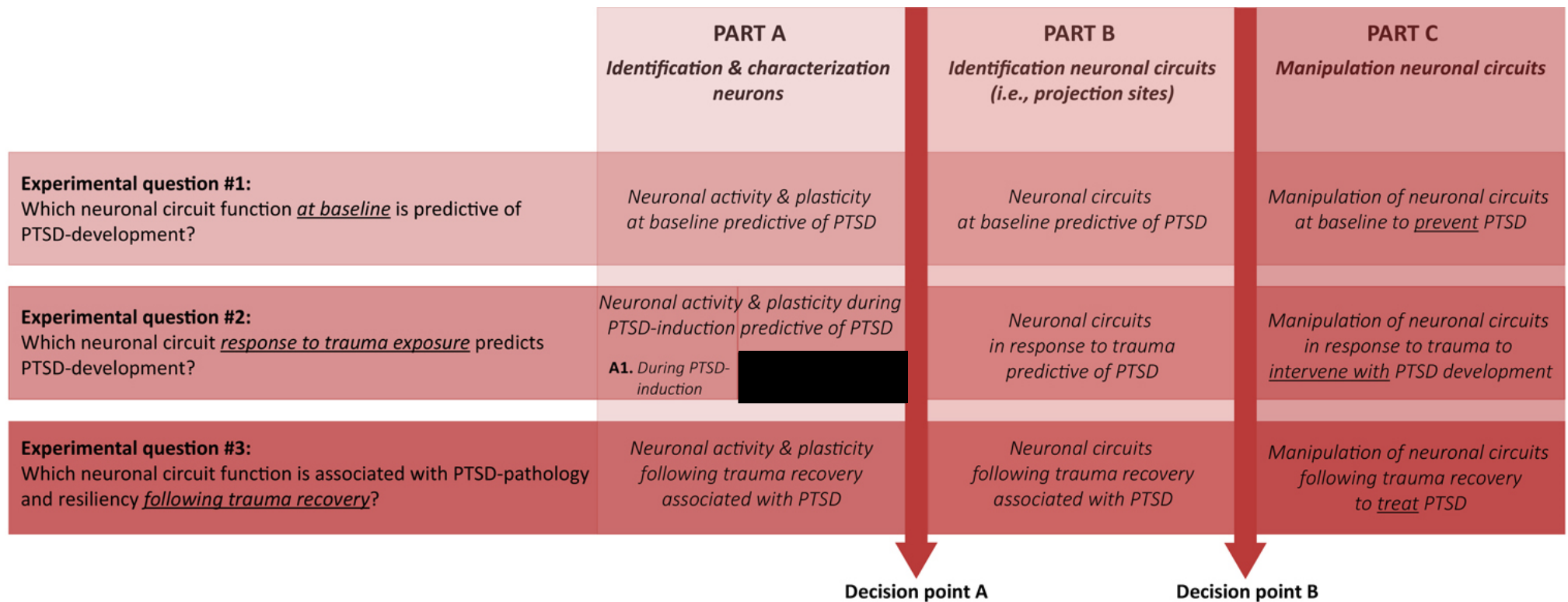


Figure 2. Experimental outline of the project proposal. The three experimental questions will be addressed in separate, independent experiments (1-3), of which each consists of three parts (A-C) that are dependent on each other. Therefore, two decision points will be implemented (A & B), at which is determined whether continuation of the experiment to parts B and C should be pursued (see section 3.4.3. for more details).

References

1. [REDACTED]

2. [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.

As explained in 3.4.1, the characterization of aberrant neuronal signalling associated with PTSD will occur at three different stages (i.e., baseline, in response to trauma, and after recovery) and will be investigated in several subsequent steps (**parts A-C**). First, the affected neuronal population is identified and will be characterized in terms of neurobiological makeup. Next, its projection sites will be determined. Lastly, the corresponding neuronal circuit is manipulated [REDACTED], to deliver causative evidence.

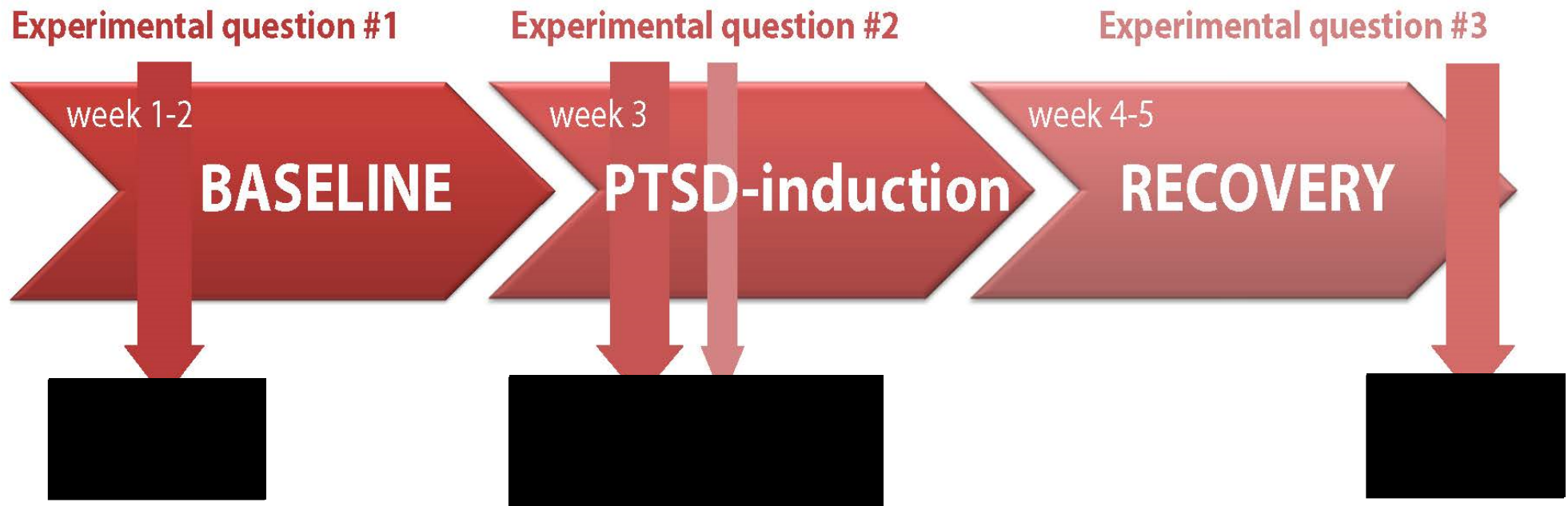


Figure 3. Experimental time line of the proposed experiments. [redacted] at baseline will occur for experimental question #1, just prior to PTSD-induction for research question #2, and following trauma recovery for research question #3. The labeling of neuronal activity/plasticity during these time periods will be compared [redacted] animals and thereby allow for the identification and characterization of aberrant neuronal circuit function associated with PTSD. [redacted]

PTSD-induction protocol

For all of these studies, mice will be exposed to a well-established mouse PTSD model (1) to induce a PTSD-like phenotype [redacted]. Briefly, animals are exposed to a trauma (electric foot shock) [redacted]. Animals get a week to recover and are subsequently phenotyped on typical PTSD-behaviors (2), [redacted]. A detailed description of individual tests is provided in the Animal Procedures.

Part A.

To identify aberrant neuronal activation and plasticity in PTSD [REDACTED] animals, two transgenic mouse lines will be used, [REDACTED] Mice are subjected to the PTSD-induction protocol and [REDACTED] either at baseline (question #1), just prior to PTSD-induction (question #2, A1), or after recovery once the pathology has been established (question #3), to indelibly label their neuronal activity/plasticity patterns in these corresponding periods. At the end of the protocol, animals will be sacrificed and neuronal labeling in [REDACTED] PTSD [REDACTED] brains will be compared. Moreover, to answer question #2, we will narrow down the time window of aberrant neuronal activation and plasticity by looking into trauma [REDACTED]-induced neuronal activation and plasticity separately, providing us with more detailed (and sensitive) information on the required activation and plasticity patterns for PTSD-development. [REDACTED]

To characterize the neurobiological makeup of the activated/plastic neuronal populations (differentiating the PTSD-susceptible from [REDACTED] brain) we will **first sort (i.e., isolate) the fluorescently labeled cells using Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) and perform quantitative PCR on the cells to identify activity/plasticity- and stress-related genes with 1) high expression levels in the identified neuronal subpopulation (which could potentially serve as cell marker in Part B), or 2) altered expression levels [REDACTED], which is informative on the underlying cause of altered activity/plasticity in these cells. These experiments will be followed-up by immunohistochemistry and *in situ* hybridization experiments on the brain slices acquired from the first batch of animals, to determine the specificity of the qPCR findings (i.e., whether the expression of certain genes is restricted to the identified cell population) and inform us on the potential of certain cell markers for Part B.**

Part B.

Next, we will identify the projection sites of the neurons identified in Part A (and thus the neuronal circuit affected) by intracranial injection of Cre-dependent viral vectors (expressing a fluorescent label) in the brain regions of interest and subsequent analyses of its expression sites. Depending on the neuronal subpopulation identified in Part A (decision point A), this injection will either happen in [REDACTED] mice prior to the PTSD-induction protocol and [REDACTED], or in specific Cre-lines for the neuronal subpopulation identified (as further specified in the Animal Procedures).

Part C.

To manipulate the neuronal circuit we will make use of optogenetics, a technique in which the activity of genetically modified neuronal populations can be manipulated by light. In these experiments, the intracranial injection of a viral vector expressing the opsin might be required, as well as the implantation of optic fibers for local light delivery. Depending on the neuronal circuit identified in Part B, several scenarios for optogenetic manipulation are possible (decision point B), which are described in detail in the Animal Procedures.

References

1. [REDACTED]
2. [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

As described in 3.4.1. (Research Strategy), the approach of this project is to perform the **experiments necessary to answer our 3 (related, but independent) research questions** in a sequential manner.

- Firstly, a screening of neuronal activation/plasticity patterns will be performed, comparing the PTSD-██████████ brain at several stages throughout PTSD-development, to identify the most pronounced differences in neuronal activity/plasticity (part A), followed by a characterization of this neuronal cell population in terms of gene-expression patterns and neurobiological makeup.*

- Secondly, this identification of affected neurons will be followed up by a more in-depth characterization of the neuronal circuits they are part of (Part B).**

- Finally, these neuronal circuits in the PTSD-██████████ brain are manipulated to ██████████, and thereby provide evidence for a causal relationship between the circuit and PTSD-██████████ (Part C).

Thereby, this project will produce output parameters covering a wide spectrum from the macroscopic systems level to the microscopic molecular level; ranging from behavioral parameters (anxiety levels, exploration, etc.), to neuronal circuits, activation patterns and neurobiological makeup. These data will be combined and compared across experiments, to - in the end - sketch a coherent picture of the neuronal activation dissociating the PTSD-██████████ brain. The identification of PTSD risk factors (at all these levels), predicting PTSD-development even prior to trauma exposure (question #1), will be one milestone. The identification of immediate response factors to trauma exposure predicting later PTSD-development (question #2), will be a second milestone. The identification of biomarkers related to PTSD pathology (question #3) will be a third milestone.

*: Decision point A: If in the first part of the proposal (Part A) no clear neuronal target (i.e., neuronal subpopulation) can be identified for one of the questions #1-#3 (i.e., clearly abnormal neuronal activity/plasticity of a neuronal subpopulation at baseline (#1), in response to trauma exposure (#2), and following recovery (#3)), the second (Part B) and third steps (Part C) of the proposal will not be pursued for this question. Practically, this means that if we do not observe significant differences in the amount of labeled neurons (indicating their history of activity/plasticity) in any brain region for the PTSD-██████████ animals, part B and C will not be pursued using the same protocol. If such significant differences are observed, we will focus on the brain region with the largest difference (i.e., effect size) and most homogeneous cell population identified.

** : If in the second part of the proposal (Part B) no clear neuronal target (i.e., neuronal circuit) can be identified for one of the questions #1-#3 (i.e., clearly abnormal neuronal activity/plasticity of a neuronal circuit at baseline (#1), in response to trauma exposure (#2), and following recovery (#3)), the third step (Part C) of the proposal will not be pursued for this question. Practically, this means if we cannot identify significant projections of the neuronal subpopulation identified in Part A, we will refrain from attempting to manipulate this circuit in Part C. If sparse projections are observed (but consistent among animals) we will manipulate the activity/plasticity of the cells (from Part A) themselves in Part C, instead of performing photostimulation of their projection sites.

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	A. Identification of PTSD-associated neuronal activation and plasticity
2	B. Characterization of PTSD-associated neuronal circuits
3	C. Manipulation of PTSD-associated neuronal circuits

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure A. Identification of PTSD-associated neuronal activation and plasticity

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.

General design:

Our approach is to implement a PTSD-induction protocol, existing of a trauma (electric shock) followed by [REDACTED] to induce PTSD-like behavior [REDACTED] animals. A week after PTSD-induction, animals will be tested in a set of behavioral tests (i.e., [REDACTED]) assessing PTSD-symptomatology, and their neuroendocrine function will be tested (corticosterone response to restraint [REDACTED]). In order to obtain insight into the neuronal activation and plasticity patterns associated with PTSD, neuronal activity and plasticity will either be labeled at 1) baseline, 2) in response to PTSD-induction (i.e., trauma [REDACTED] exposure), or 3) following recovery (once the pathology has been established), and PTSD-[REDACTED] animals will be compared. The labeling of neuronal activation and plasticity will occur by making use of two transgenic mouse lines, [REDACTED], each targeting a different subset of neurons; those displaying increased neuronal firing (i.e. activity) vs. those displaying increased neuronal plasticity, respectively. [REDACTED]

Three weeks after the end of the experimental protocol, animals will be sacrificed. **Two groups of mice (in parallel) will be used for each experiment, of which one will be sacrificed by decapitation to perform gene-expression analyses on the labeled cells using FACS and qPCR to identify activity/plasticity-related genes and stress-related genes with either high overall expression levels in the fluorescently labeled cells (which could potentially indicate their potential as neuronal marker for Part B of the proposal), or altered expression levels in the labeled cells of PTSD-[REDACTED] animals; informing us on the underlying mechanisms of the observed differences in neuronal plasticity/activity in these groups. The other group will be sacrificed by perfusion fixation to analyze their brain for expression of the fluorescent marker, and perform *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments to characterize their neurobiological make up and identify potential neuronal markers for Part B of the proposal.**

Experimental question #1:

Which neuronal circuit function at baseline is predictive of PTSD-development?

Experimental question #2:

Which neuronal circuit response to trauma exposure predicts PTSD-development?

Experimental question #3:

Which neuronal circuit function is associated with PTSD-pathology and resiliency following trauma recovery?

**Identification & characterization
neurons**

*Neuronal activity & plasticity
at baseline*

A1. *Neuronal activity & plasticity
during trauma*

A2. *Neuronal activity & plasticity
during trauma*

A2. *Neuronal activity & plasticity
during*

*Neuronal activity & plasticity
following trauma recovery*

Figure 4. Experimental design of Part A.

Primary outcome parameters:

- Behavioral phenotype; [REDACTED]
- Neuroendocrine function; [REDACTED]
- Pattern of neuronal activation and plasticity at baseline (question #1; [REDACTED]) & **gene expression pattern and** neurobiological makeup of the identified cells
- Pattern of neuronal activation and plasticity in response to trauma [REDACTED] exposure (question #2; [REDACTED]) & **gene expression pattern and** neurobiological makeup of the identified cells
- Pattern of neuronal activation and plasticity following recovery (question #3; [REDACTED]) & **gene expression pattern and** neurobiological makeup of the identified cells

Justification:

The set of behavioral output measures is critical [REDACTED]. Moreover, since neuroendocrine abnormalities are associated with PTSD, we include these measures as well to try to associate them with aberrant neuronal activation and/or plasticity in PTSD. The differences in neuronal activation and/or plasticity between [REDACTED] and PTSD-like animals at baseline will inform us about neuronal activation constituting a risk factor for PTSD-development. The differences in neuronal activation and/or plasticity between [REDACTED] and PTSD-like animals in response to trauma/[REDACTED] exposure will inform us about neuronal activation constituting an immediate marker of PTSD-risk in reaction to trauma exposure. The differences in neuronal activation and/or plasticity between [REDACTED] and PTSD-like animals after recovery informs us about neuronal activation reflecting PTSD-pathology, and is therefore a useful target for treatment.

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

I. Basal anxietyOpen Field Test.

To assess basal anxiety, mice will be tested in the open field test. This test is based on the animals' natural conflict between exploration of and the aversion against open, bright areas. The open field apparatus consists of a white Plexiglas box (50 x 50 x 40 cm) lightened with 120 lux. Each mouse will be placed in the corner of the apparatus to initiate a 10 min test session. Time spent in the center (the inner 25 x 25 cm), distance traveled in the center, number of visits to the center, and total distance traveled will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by Ethovision software (Noldus, Wageningen, Netherlands).

Elevated Plus Maze.

As a second test for basal anxiety, the elevated plus maze will be used, which is also makes use of the rodents' aversion of open spaces. The elevated plus maze comprises a central part (5 x 5 cm), two opposing open arms (30.5 x 5 cm), and two opposing Plexiglas closed arms (30.5 x 5 x 15 cm), elevated at a height of 53.5 cm and the open arms are illuminated with 6-9 lux. Mice are placed in one of the closed arms facing the center to initiate a 5 min test session. Time spent in the open arms, distance traveled in the open arms, and number of visits to the open arms will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by Ethovision software (Noldus, Wageningen, Netherlands).

II. PTSD-induction

For these studies, male, adult mice will be exposed to a well-established mouse PTSD model (([REDACTED]) to induce a PTSD-like phenotype [REDACTED] animals. The model begins on day [REDACTED], in which mice receive 14 shocks of 1 mA, 1 s in duration over 85 min at variable intervals, representing the "trauma". On day [REDACTED]. Shocks will be given in a fear-conditioning apparatus. [REDACTED]

[REDACTED] sloping roof placed on the metal grid floor, [REDACTED]

III. Behavioral tests for PTSD identification (phenotyping)

Mice are tested in five behavioral tests to determine whether they developed PTSD, each assessing different aspects of PTSD-symptomatology: [REDACTED]

One of the features of PTSD tested for is the impairment in risk assessment. In PTSD patients this dysfunction often manifests itself as paranoia (4) and risky behavior demonstrated by high incidences of violence, drug abuse, or suicide (5,6). The PTSD-like mice also show risk assessment patterns consistent with an immediate or imminent danger in the face of a predator and not to an uncertain potential for risk. Mice normally engage in oriented information-gathering scanning from place of concealment and increases in stretch attend posture (7,8) in the absence of a predator, but in the presence of a predator this activity is reduced in favor of quick flight. Increased risk assessment is also associated with reduced anxiety (9). We will measure risk assessment using the dark/light transfer test (1). The test apparatus consists of a box divided by a partition into two environments: a dark covered compartment (15 x 20 x 25 cm) and a brightly illuminated (1000–1100 lux) light compartment (30 x 25 x 25 cm). The compartments are connected by a small passage in the bottom center of the partition. The mice are placed in the dark compartment to initiate a 5 minutes test session. Time spent in the light zone, number of visits to the light zone and the latency entering the light zone will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by ([REDACTED]). An additional arena of 3 cm lengthwise by 6 cm width-wise will be programmed into the software tracking measurements surrounding the opening of the light area. Time spent in the risk assessment area and the number of visits to the risk assessment area are measured. Percentage risk assessment time will be calculated as the amount of time spent in the risk assessment arena as a percentage of total time spent in the light area outside of the risk assessment zone. [REDACTED]

Latency to peak startle amplitude and pre-pulse inhibition.

Exaggerated startle is one of the DSMIV criteria for PTSD (10), reflecting hyperarousal in patients. Moreover, impaired pre-pulse inhibition, a measure of sensorimotor gating but also a test that requires attentional processes, has been reported for PTSD (11). To assess the animals' (latency to) peak startle and the amount of pre-pulse inhibition we here use an acoustic startle protocol. The proposed protocol is similar to those reported before (1,12). Briefly, mice are placed in a small Plexiglas cage on top of a vibration-sensitive platform in a sound-attenuated, ventilated chamber. A high-precision sensor, integrated into the measuring platform, detects movement. Two high-frequency loudspeakers inside the chamber produce all the audio stimuli. The acoustic startle response (ASR) session begins with 5 min acclimation to white background noise (70 dB) maintained through

the whole session. Thirty-two startle stimuli (120 dB, 40 ms in duration with a randomly varying ITI of 12–30 s) are presented interspersed with an additional 40 startle stimuli randomly preceded by 40 ms prepulses of either 74 dB, 78 dB, or 82 dB. Maximal ASR and latency to peak startle amplitude are measured both in response to individually presented startle stimuli and in response to startle stimuli preceded by pre-pulses. Percentage pre-pulse inhibition (PPI) will be calculated as the percent difference between the maximal ASR (max G) to startle stimuli preceded by pre-pulses compared to that without. [REDACTED]

Marble burying.

Marble burying will be assessed to measure hypervigilance and overall anxiety in the animals (13). Mice are placed in a compartment illuminated by 10 lux with dimensions (30 × 27 × 26 cm) containing 5 cm autoclaved bedding with 20 marbles centrally arranged 4 by 5. Mice are then filmed for 25 min. Videos are scored by counting the number of unburied marbles every 5 minutes until the end of the test (14). [REDACTED]

Homecage locomotion.

Homecage locomotion is assessed using the observation (Phenotyper) cages. Mice are housed individually for 72 h, in which the first 24 h are considered habituation to the individual housing conditions. Measurements of general locomotion consist of two light and two dark cycles in the last 48 h collected at 10 min intervals (1). [REDACTED]

[REDACTED] This test models the sleeping problems PTSD patients suffer from (10). Most patients will reach a clinical setting initially due to insomnia or disturbing nightmares, which to date have no specific cure.

Evaluation of [REDACTED]

IV. Assessment of neuroendocrine function

Based on **the suggested role of the stress hormone corticosterone in stress recovery (15,16)** and the observation of neuroendocrine abnormalities in PTSD-patients, be it either in basal state or following a challenge (17,18), we will also monitor neuroendocrine function [REDACTED] mice over the course of PTSD-development, and later correlate these measures with neuronal activation. This will inform us on the potential causal relationship between neuroendocrine signaling and brain function and the supposed potential of corticosterone administration as treatment for PTSD (19,20). Therefore, corticosterone levels will be assessed by tail bleed (10 µL) 12 times over the course of the experiment.

- Two repetitions of basal corticosterone measurements in the morning (at the circadian peak) and evening (at the circadian trough); both at the start and at the end of the experiment (total = 8 measurements)
- Stress response corticosterone levels will be assessed in response to trauma and trigger (total = 2 measurements)
- Stress response corticosterone levels will be assessed in response to restraint stress; both at the start and at the end of the experiment, once pathology has been established (total = 8 measurements)

V. Restraint stress

To measure the corticosterone stress response and subsequent recovery, animals will be exposed to 25 min restraint stress in plastic restrainers. Plasma will be extracted from blood samples (10 µL) that are collected by tail bleed at four time points: under basal conditions, at 25 min (i.e., immediately when removed from the restrainer), 75 min, and 120 min following stress initiation. This exact protocol has been used before to show abnormal corticosterone responding to stress in PTSD-like animals (1), and correlational analyses with the brain findings will inform us on the neural basis of these changes.

VI. [REDACTED]

In order to label the neurons displaying activity or plasticity over a certain time bin (baseline, trauma/[REDACTED] exposure, after recovery), mice will be [REDACTED] at different time points in the experimental design. Moreover, to answer question #2, we will narrow down the time window of aberrant neuronal activation and plasticity by looking into trauma & [REDACTED]-induced neuronal activation and plasticity separately, providing us with more detailed (and sensitive) information on the required activation and plasticity patterns for PTSD-development. [REDACTED]

[REDACTED] is absolutely critical for [REDACTED]

[REDACTED] Thereby we will get more detailed temporal-dynamic information and less background signal about adaptive and maladaptive responding to the traumatic experience. Such temporal precision is not required for the labeling of basal neuronal activity and plasticity (as targeted for questions #1 and #3), making that [REDACTED] will be sufficient in those cases.

VII. Sacrifice

Group 1. For histological read-out of neuronal activity/plasticity **in terms of fluorescent labeling, as well as later *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments**, animals will be sacrificed by an overdose of anesthesia followed by transcardial perfusion with saline and fixative.

Group 2. For the quantification of gene expression in the identified neurons (displaying aberrant activity/plasticity associated with a PTSD-like phenotype), animals will be sacrificed using rapid decapitation (with no anesthesia).

The total duration of the experiment will be 3 months maximum.

VIII. Identification and characterization of neuronal populations

Group 1. Following the transcordial perfusion, brains will be extracted, and brain slices will be prepared. One set of brain slices will be used for the identification of neuronal populations (and brain regions) displaying aberrant activity/plasticity in PTSD- [REDACTED] animals (done by the comparison of the counted number of labeled cells). The other sets of brain slices will be used for immunohistochemistry and *in situ* hybridization experiments to characterize the cells in terms of excitatory or inhibitory nature, and their expression of activity-, plasticity- and stress-related proteins, as well as activity-, plasticity-, and stress-related gene transcription.

Group 2. Following decapitation, brains will be extracted and immediately frozen on dry ice. Punches of relevant brain regions (as identified in group 1) will be obtained and prepared for FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting). Following the isolation of the fluorescently labeled cells, qPCR experiments will be performed to analyse the expression patterns of stress-related and activity/plasticity-related genes.

References

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]
4. Campbell ML, Morrison AP (2007). The psychological consequences of combat exposure: the importance of appraisals and posttraumatic stress disorder symptomatology in the occurrence of delusional-like ideas. *Br J Clin Psychol* 46(Pt 2): 187–201.
5. Panagioti M, Gooding P, Tarrrier N (2009). Post-traumatic stress disorder and suicidal behavior: a narrative review. *Clin Psychol Rev* 29: 471–482.
6. Najt P, Fusar-Poli P, Brambilla P (2011). Co-occurring mental and substance abuse disorders: A review on the potential predictors and clinical outcomes. *Psychiatry Res* 186: 159–164.
7. Blanchard DC, Blanchard RJ, Tom P, Rodgers RJ (1990) Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology* 101: 511–518.
8. Blanchard RJ, Blanchard DC (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103: 70–82.
9. Adamec RE, Shallow T (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav* 54: 101–109.
10. American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV)* (Washington, DC, American Psychiatric).
11. Grillon C, Morgan CA, Southwick SM, Davis M, Charney DS (1996). Baseline startle amplitude and prepulse inhibition in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 64: 169–178.
12. Neufeld-Cohen A, Tsoory MM, Evans AK, Getselter D, Gil S, Lowry CA, Vale WW, Chen A (2010). A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19020–19025.
13. Njung'e K, Handley SL (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 38(1): 63-67.
14. Sztainberg Y, Kuperman Y, Justice N, Chen A (2011). An anxiolytic role for CRF receptor type 1 in the globus pallidus. *J Neurosci* 48: 17416–17424.
15. Het S, Schoofs D, Rohleder N, Wolf OT (2012). Stress-induced cortisol level elevations are associated with reduced negative affect after stress: indications for a mood-buffering cortisol effect. *Psychosom Med* 74(1): 23-32.

16.

17. Yehuda R (2001). Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 17: 41-46.

18. Daskalakis NP, Lehrner A, Yehuda R (2013). Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42(3): 503-513.

19. Schelling G, Briegel J, Roozendaal B, Stoll C, Rothenhäusler HB, Kapfhammer HP (2001). The effect of stress doses of hydrocortisone during septic shock on posttraumatic stress disorder in survivors. *Biol Psychiatry* 50(12): 978-985.

20. Zohar J, Yahalom H, Kozlovsky N, Cwikel-Hamzany S, Matar MA, Kaplan Z, Yehuda R, Cohen H (2011). High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(11): 796-809.

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

Since Part A involves a brain wide scan for potential brain regions and neuronal subpopulations of interest, we are rather conservative in the numbers of animals included in this section, to ensure proper statistical power to identify targets.

. Previous studies implementing this strategy (1-3), have already successfully identified neural differences between these groups. Moreover, the all-or-nothing strategy mimics the human situation, in which patients are either diagnosed with PTSD (meeting multiple criteria of stressor exposure, intrusion symptoms, avoidance, alterations in arousal and reactivity, and negative alterations in cognition and mood) or not (4). For this initial screen, we estimate to need 12 mice per group. We will calculate the precise group sizes per experiment using a power analysis, based on data collected so far by us and others. As only 25% of all trauma-exposed animals is expected to either display a PTSD-like phenotype, we have to expose 48 mice per group to end up with these group sizes.

Once these first analyses have identified interesting targets, we will explore correlational analyses between these outcome measures and PTSD-scores of all animals, to test whether correlational analyses are suitable and sufficient for the experiments described in Part B and C of this proposal.

The following groups, as introduced in the project proposal, will be assessed:

1. PTSD-induction at baseline (question #1)
2. PTSD-induction at trauma (question #2a1)
3. PTSD-induction at trauma (question #2a2)
4. PTSD-induction (question #2a2)
5. PTSD-induction at end (question #3)

= 5x 48 mice, is 240 mice.

Furthermore, to be able to specifically identify neuronal activity/plasticity specifically related to the trauma/█ exposure (instead of to e.g., █ stress or novelty induced stress) also 12 control animals will be included for groups 2-4, which are not exposed to PTSD-induction, but do receive the injection. Moreover, the inclusion of these control animals will inform us about the adaptive (adequate) response to the trauma█ in the█ animals. This all adds up to █ mice per experiment in total.

Arc-CreERT2

6. PTSD-induction █ at baseline (question #1)
7. PTSD-induction █ at trauma█ (question #2a1)
8. PTSD-induction █ at trauma (question #2a2)
9. PTSD-induction █ (question #2a2)
10. PTSD-induction █ at end (question #3)

= 5x 48 mice, is 240 mice.

to be able to specifically identify neuronal activity/plasticity specifically related to the trauma█ exposure (instead of to e.g., █ stress or novelty induced stress) also 12 control animals will be included for groups 7-9, which are not exposed to PTSD-induction, but do receive the injection . Moreover, the inclusion of these control animals will inform us about the adaptive (adequate) response to the trauma█ in the█ animals. This all adds up to █ mice per experiment in total.

Since we need both perfused brain tissue (to initially identify the brain regions of interest with neurons displaying aberrant activity/plasticity by fluorescent cell counting, and perform later *in situ* hybridization and immunohistochemistry experiments), and fresh brain tissue (to analyze the gene-expression patterns associated with this altered function (characterizing the neurons)), we will need two groups for each experiment, which are sacrificed by perfusion fixation and decapitation, respectively.

Thus, we need to double the number of animals; resulting in a total of 1104 animals required for these experiments.

N.B. Throughout all procedures data dropout and loss of animals will be minimized by careful execution of the experiments and close monitoring animal welfare.

References

1.

2.

3.

- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV)* (Washington, DC, American Psychiatric).

B. The animals

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

The mouse is the lowest animal species in which we are able to model human psychiatric disorders. Because of the complexity of the brain and symptomatology to diagnose these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In comparison with humans, the mouse offers the possibility to precisely control environmental conditions, such as the timing and type of trauma exposure, and all pre-, peri-, and post-trauma factors potentially influencing an eventual disease outcome. This is not possible in humans.

Furthermore, the proposed PTSD-protocol has been validated in mice. Here, we propose to use mice from two specific transgenic mouse lines; [REDACTED]

[REDACTED] Both transgenic lines label a distinct set of neurons and have their own characteristics in terms of selectivity (background labeling) and sensitivity ([REDACTED]), and therefore of added value to each other. Moreover, PTSD in human patients has been linked to both abnormal neural activity (2,3) and connectivity - reflecting plasticity - (4,5), making it necessary to target both processes independently.

References:

- [REDACTED]
- Bremner JD (2002). Neuroimaging studies in post-traumatic stress disorder. *Curr Psychiatry Rep* 4: 254-263.
- Shin LM, Rauch SL, Pitman RK (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071: 67-79.
- Peterson A, Thome J, Frewen P, Lanius RA (2014). Resting-state neuroimaging studies: a new way of identifying differences and similarities among anxiety disorders? *Can J Psychiatry* 59(6): 294-300.
- Kim MJ, *et al.* (2011). The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Behav Brain Res* 223(2): 403-410.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	[REDACTED]	1104	adult (>8 weeks old)

C. Re-use

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

The mouse is the lowest animal species in which we are able to model human psychiatric disorders. Because of the complexity of the brain and symptomatology to diagnose these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In comparison with humans, the mouse offers the possibility to precisely control environmental conditions, such as the timing and type of trauma exposure, and all pre-, peri-, and post-trauma factors potentially influencing an eventual disease outcome. This is not possible in humans.

Reduction

The requested amount of animals (based on a group size of $n = 12$) is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. As only a subset of the total amount of trauma-exposed animals will develop PTSD (25%) and [REDACTED] the total group size has to be (4x) larger. Following the identification of neuronal subpopulations of interest (in which differences between PTSD-like [REDACTED] animals are observed), we will explore correlational analyses between these outcome measures and the PTSD-score in all animals to test whether correlational analyses are also a useful tool to explore differences in PTSD-symptomatology. If this is the case, we will refer to correlaitonal analyses for the experiments described in Part B and C of this proposal.

Refinement

The experiments will be carried out with the least discomfort possible. However, exposure to electrical shocks (and the discomfort caused by them) is critical to the induction of PTSD and therefore unavoidable.

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

Although the PTSD-induction procedure will be aversive to the animals, no physical adverse effects are expected. Animals will be monitored closely for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Humane End Point conditions. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to the housing at a reverse day/night rhythm will be applied. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

The electric footshocks required for PTSD-induction will cause discomfort in the animals and will most likely be experienced as slightly painful. However, this procedure (and the discomfort caused by it) is critical to our manipulation; no pain relief can 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 experience severe discomfort during the PTSD-induction procedure, moderate stress during the restraint stress session, mild discomfort due to the [REDACTED] and tail blood collection, and very mild psychological discomfort in the behavioral tests assessing basal anxiety and PTSD phenotype (due to light, novelty, or temporary single housing to assess their activity in the light phase). However, none of these potential stressors are associated with physical damage to the animals.

The proposed transgenic mouse lines do not display a behavioral phenotype (1), and are therefore not associated with any expected discomfort.

References

1. [REDACTED]

Explain why these effects may emerge.

The cause of the stress of the mice is either primarily physical in nature (in case of foot shock, restraint stress, and blood sampling), or novelty/light-induced (in case of behavioral testing). These stressors are however necessary for these experiments to succeed.

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

Although some stressors are inherent to the experimental design, we will take precautionary measures to minimize all other potential causes of (additional) stress to the animals, e.g., by habituation to reverse cycle housing, and only partial cleaning of the housing cages to retain hierarchy (and thereby prevent fighting to re-establish this hierarchy). Moreover, i.p. injections and tail blood collection will only be performed by experienced researchers to minimize discomfort.

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 criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one day is considered as a humane endpoint. Also (a combination of) general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), and poor coat conditions are considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized.

*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

It is unexpected that any of the animals reach the human end point over the course of the experiment. So far, the primary researcher has exposed ~120 mice to the PTSD-induction protocol without witnessing any physical adverse effects. The human endpoint was only applied once (after consulting a veterinarian), when a mouse was sacrificed because it suffered from severe wounds from excessive fighting with a dominant cage mate, but this occurred prior to PTSD-induction.

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 total (cumulative) discomfort of the animals is expected to be severe (due to exposure to the PTSD-induction protocol).

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 brains of the animals are needed to analyse the neuronal activation patterns present at the different stages of PTSD-development (questions #1-3), and the neurobiological make up of these cells, i.e., the aim of objective A.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 2	Type of animal procedure B. Characterization of PTSD-associated neuronal circuits

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In Part B of this proposal, we aim to identify the neuronal circuits involved in PTSD, by determining the projection sites of the neurons identified in Part A of this proposal. To do so, we will intracranially inject a fluorescent virus in the region of interest, and analyze its expression sites. Depending on the results of Part A, we will implement one of two approaches (Figure 3). Approach II will be followed if the neuronal subpopulation identified can be captured by a single, available transgenic mouse line, whereas we will use approach I if this is not the case. In case of the latter, the neuronal subpopulation identified in Part A of the proposal first has to be labeled again with Cre-recombinase expression, before projection sites can be labeled by viral injection.

Experimental question #1:

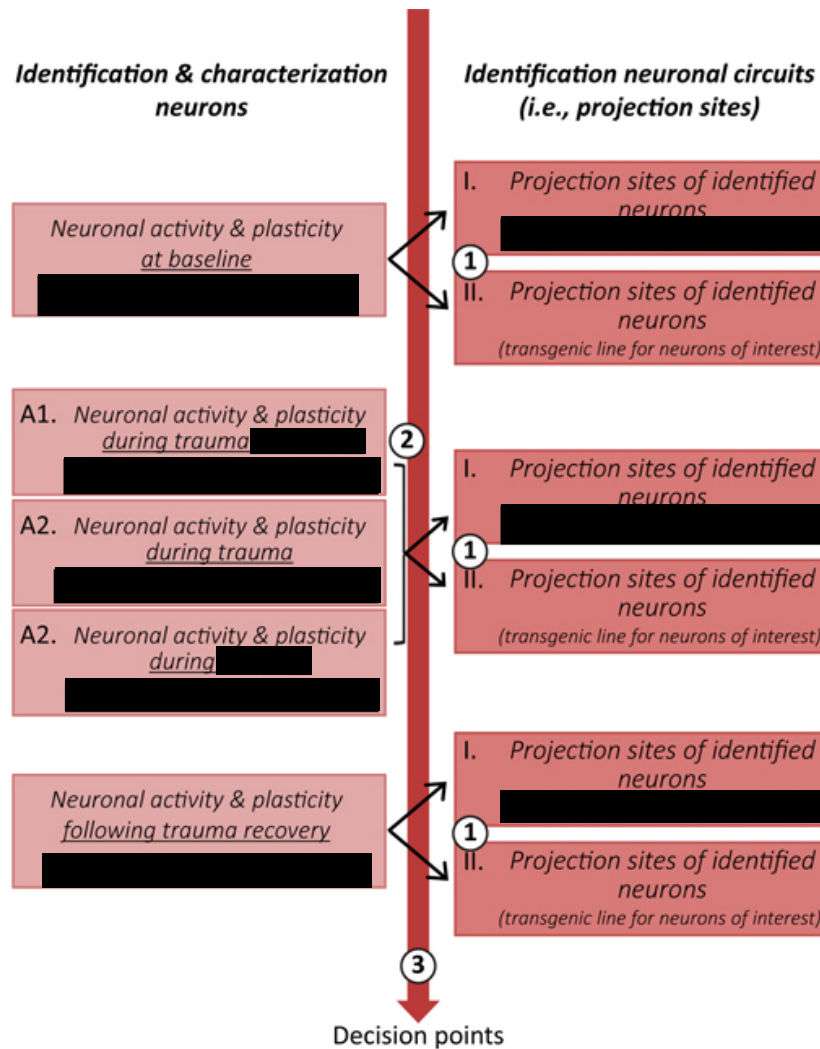
Which neuronal circuit function at baseline is predictive of PTSD-development?

Experimental question #2:

Which neuronal circuit response to trauma exposure predicts PTSD-development?

Experimental question #3:

Which neuronal circuit function is associated with PTSD-pathology and resiliency following trauma recovery?



Decision points:

- ① If the neuronal subpopulation identified in Part A can be captured by a single available transgenic mouse line, approach II will be followed to reduce the amount of discomfort and the number of animals required
- ② Part A1 and A2 allow for the most selective identification of the neuronal subpopulation responsible for later PTSD-development; we will only continue working with the protocol best targeting this population for Part B
- ③ Following the completion of Part A, we will carefully consider (through power analyses) if the number of animals required for Part B of the proposal can be further reduced by taking the intermediate PTSD-phenotypes into consideration (by performing correlational analyses)

Figure 5. Experimental design of Part B of the proposal.

APPROACH I:

General design

This approach is very similar to that described in Part A of the proposal. We will expose two transgenic mouse lines, [REDACTED] mice, to a PTSD-induction protocol, existing of a trauma (electric shock) [REDACTED] PTSD-like behavior in [REDACTED] of animals. A week after PTSD-induction, animals will be tested in a set of behavioral tests ([REDACTED]) assessing PTSD-symptomatology, and their neuroendocrine function will be tested (corticosterone response to restraint stress); [REDACTED]. As in Part A, active and plastic neuronal circuits will either be labeled at 1) baseline, 2) in response to PTSD-induction (i.e., trauma and/or [REDACTED] exposure), or 3) following recovery (once the pathology has been established), to obtain insight into the neuronal circuits associated with PTSD, and PTSD-[REDACTED] animals will be compared. However, now the labeling of active/plastic neuronal circuits will occur by intracranial injection of Cre-dependent eYFP virus in the brain region of interest in these mice. [REDACTED]. Three weeks after the end of the experimental protocol, animals will be sacrificed by perfusion fixation and their brains analyzed for expression of the fluorescent marker to identify the projection sites (circuits) of the neurons displaying aberrant activation.

Primary outcome parameters

- Behavioral phenotype; [REDACTED]
- Neuroendocrine function; [REDACTED]
- Pattern of active and plastic neuronal circuits at baseline (question #1); [REDACTED]
- Pattern of active and plastic neuronal circuits in response to trauma & trigger exposure (question #2); [REDACTED]
- Pattern of active and plastic neuronal circuits following recovery (question #3); [REDACTED]

Justification

The set of behavioral output measures is critical for the classification of animals [REDACTED] PTSD-[REDACTED]. Moreover, since neuroendocrine abnormalities are associated with PTSD, we include these measures as well to try to associate them with aberrant neuronal circuits in PTSD. The differences in activated and/or plastic neuronal circuits between [REDACTED] and PTSD-like animals at baseline will inform us about neuronal circuits which activity constitutes a risk factor for PTSD-development. The differences in activated and/or plastic neuronal circuits between [REDACTED] and PTSD-like animals in response to trauma [REDACTED] exposure will inform us about neuronal circuits which activation and/or plasticity reflects an immediate marker of PTSD-risk in reaction to trauma exposure. The differences in activated and/or plastic neuronal circuits between [REDACTED] and PTSD-like animals after recovery informs us about those circuits which activity and/or plasticity is associated with PTSD-pathology, and is therefore a useful target for treatment.

APPROACH II:

General design

As described before we will characterize the neurobiological makeup of the activated and plastic neuronal populations (differentiating the PTSD-susceptible from [REDACTED] brain) and perform **qPCR**, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization experiments on the brain slices acquired in Part A. These experiments will allow us to identify the neuronal subpopulations displaying aberrant activation and/or plasticity associated with PTSD. If the neuronal subpopulation identified in Part A, primarily exists of a single cell type that can be captured in an available transgenic mouse line, we could also trace their neuronal projections (and thus the neuronal circuit affected) by merely intracranially injecting specific Cre-lines for the neuronal subpopulation identified. This approach will provide us information on the projection sites of the genetically specified subpopulation. This second approach will reduce the number of animals needed for these experiments, and reduce the amount of discomfort the animals experience, since PTSD-induction and behavioral testing are not necessary. However, this approach can only be followed when we are able to identify a selective subpopulation of cells (which can be characterized by a single neurobiological/genetic marker) to behave differently in PTSD-[REDACTED] animals, which is only one of the many outcomes possible from Part A.

Primary outcome parameters

-Neuronal circuits associated with the neuronal subpopulation identified in Experiment A.

Justification

The neuronal circuits identified are informative on the signaling circuits of the abnormally functioning neurons in PTSD, and thus the information flow they represent. These circuits could next be targeted to prevent/treat PTSD.

References

1. Bremner JD (2002). Neuroimaging studies in post-traumatic stress disorder. *Curr Psychiatry Rep* 4: 254-263.
2. Shin LM, Rauch SL, Pitman RK (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071: 67-79.
3. Peterson A, Thome J, Frewen P, Lanius RA (2014). Resting-state neuroimaging studies: a new way of identifying differences and similarities among anxiety disorders? *Can J Psychiatry* 59(6): 294-300.
4. Kim MJ, *et al.* (2011). The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Behav Brain Res* 223(2): 403-410.

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

APPROACH I:

I. Intracranial injection

At the start of the experiment, transgenic mice will be intracranially injected in the region of interest identified in Part A of the proposal with an AAV-virus encoding a Cre-dependent yellow fluorescent protein. Prior to injection, all mice will receive analgesics (buprenorphine, subcutaneously)

injected) followed by inhalation of isoflurane anesthesia. Mice will be positioned on a stereotaxic instrument and a midline incision is made across the top of the skull, the periosteum is cleaned, and the brain is leveled. Cold virus will be injected using a Hamilton syringe connected to a motorized nanoinjector. To allow diffusion of the solution into the brain tissue, the needle is left for an additional 5 min after the injection, and then very slowly removed. The skin was stitched and animals are allowed to recover for a week from the surgery, and will be daily checked for symptoms of adversity. One day post-surgery animals receive a second dose of analgesics (buprenorphine, subcutaneously injected) to reduce potential discomfort (i.e., pain).

II. Basal anxiety

Open Field Test.

To assess basal anxiety, mice will be tested in the open field test. This test is based on the animals' natural conflict between exploration of and the aversion against open, bright areas. The open field apparatus consists of a white Plexiglas box (50 x 50 x 40 cm) lightened with 120 lux. Each mouse will be placed in the corner of the apparatus to initiate a 10 min test session. Time spent in the center (the inner 25 x 25 cm), distance traveled in the center, number of visits to the center, and total distance traveled will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by Ethovision software ([REDACTED]).

Elevated Plus Maze.

As a second test for basal anxiety, the elevated plus maze will be used, which is also makes use of the rodents' aversion of open spaces. The elevated plus maze comprises a central part (5 x 5 cm), two opposing open arms (30.5 x 5 cm), and two opposing Plexiglas closed arms (30.5 x 5 x 15 cm), elevated at a height of 53.5 cm and the open arms are illuminated with 6-9 lux. Mice are placed in one of the closed arms facing the center to initiate a 5 min test session. Time spent in the open arms, distance traveled in the open arms, and number of visits to the open arms will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by Ethovision software ([REDACTED]).

III. PTSD-induction

For these studies, male, adult mice will be exposed to a well-established mouse PTSD model (([REDACTED])) to induce a PTSD-like phenotype [REDACTED] animals. The model begins on day 1, [REDACTED] in duration over 85 min at variable intervals, representing the "trauma". [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

IV. Behavioral tests for PTSD identification (phenotyping)

Mice are tested in five behavioral tests to determine whether they developed PTSD, each assessing different aspects of PTSD-symptomatology:

[REDACTED]

Percentage risk assessment.

One of the features of PTSD tested for is the impairment in risk assessment. In PTSD patients this dysfunction often manifests itself as paranoia (4) and risky behavior demonstrated by high incidences of violence, drug abuse, or suicide (5,6). The PTSD-like mice also show risk assessment patterns consistent with an immediate or imminent danger in the face of a predator and not to an uncertain potential for risk. Mice normally engage in oriented information-gathering scanning from place of concealment and increases in stretch attend posture (7,8) in the absence of a predator, but in the presence of a predator this activity is reduced in favor of quick flight. Increased risk assessment is also associated with reduced anxiety (9). We will measure risk assessment using the dark/light transfer test (1). The test apparatus consists of a box divided by a partition into two environments: a dark covered compartment (15 x 20 x 25 cm) and a brightly illuminated (1000–1100 lux) light compartment (30 x 25 x 25 cm). The compartments are connected by a small passage in the bottom center of the partition. The mice are placed in the dark compartment to initiate a 5 minutes test session. Time spent in the light zone, number of visits to the light zone and the latency entering the light zone will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by ([REDACTED]). An additional arena of 3 cm lengthwise by 6 cm widthwise will be programmed into the software tracking measurements surrounding the opening of the light area. Time spent in the risk assessment area and the number of visits to the risk assessment area are measured. Percentage risk assessment time will be calculated as the amount of time spent in the risk assessment arena as a percentage of total time spent in the light area outside of the risk assessment zone. [REDACTED]

[REDACTED]

Latency to peak startle amplitude and pre-pulse inhibition.

Exaggerated startle is one of the DSMIV criteria for PTSD (10), reflecting hyperarousal in patients. Moreover, impaired pre-pulse inhibition, a measure of sensorimotor gating but also a test that requires attentional processes, has been reported for PTSD (11). To assess the animals' (latency to) peak startle and the amount of pre-pulse inhibition we here use an acoustic startle protocol. The proposed protocol is similar to those reported before (1,12). Briefly, mice are placed in a small Plexiglas cage on top of a vibration-sensitive platform in a sound-attenuated, ventilated chamber. A high-precision sensor, integrated into the measuring platform, detects movement. Two high-frequency loudspeakers inside the chamber produce all the audio stimuli. The acoustic startle response (ASR) session begins with 5 min acclimation to white background noise (70 dB) maintained through the whole session. Thirty-two startle stimuli (120 dB, 40 ms in duration with a randomly varying ITI of 12–30 s) are presented interspersed with an additional 40 startle stimuli randomly preceded by 40 ms prepulses of either 74 dB, 78 dB, or 82 dB. Maximal ASR and latency to peak startle amplitude are measured both in response to individually presented startle stimuli and in response to startle stimuli preceded by pre-pulses. Percentage pre-pulse inhibition (PPI) will be calculated as the percent difference between the maximal ASR (max G) [REDACTED]

[REDACTED]

Marble burying.

Marble burying was assessed to measure hypervigilance and overall anxiety in the animals (13). Mice are placed in a compartment illuminated by 10 lux with dimensions (30 × 27 × 26 cm) containing 5 cm autoclaved bedding with 20 marbles centrally arranged 4 by 5. Mice are then filmed for 25 min. Videos are scored by counting the number of unburied marbles every 5 minutes until the end of the test (14). [REDACTED]

Homecage locomotion.

Homecage locomotion is assessed using the observation (Phenotyper) cages. Mice are housed individually for 72 h, in which the first 24 h are considered habituation to the individual housing conditions. Measurements of general locomotion consist of two light and two dark cycles in the last 48 h collected at 10 min intervals (1). [REDACTED]

[REDACTED] This test models the sleeping problems PTSD patients suffer from (10). Most patients will reach a clinical setting initially due to insomnia or disturbing nightmares, which to date have no specific cure.

Evaluation of [REDACTED]

V. Assessment of neuroendocrine function

Based on the **suggested role of the stress hormone corticosterone in stress recovery (15,16) and the** observation of neuroendocrine abnormalities in PTSD-patients, be it either in basal state or following a challenge (17,18), we will also monitor neuroendocrine function in PTSD- [REDACTED] mice over the course of PTSD-development, and later correlate these measures with neuronal activation. This will inform us on the potential causal relationship between neuroendocrine signaling and brain function and the supposed potential of corticosterone administration as treatment for PTSD (19,20). Therefore, corticosterone levels will be assessed by tail bleed (10 µL) 12 times over the course of the experiment.

- Two repetitions of basal corticosterone measurements in the morning (at the circadian peak) and evening (at the circadian trough); both at the start and at the end of the experiment (total = 8 measurements)
- Stress response corticosterone levels will be assessed in response to trauma and [REDACTED] (total = 2 measurements)
- Stress response corticosterone levels will be assessed in response to restraint stress; both at the start and at the end of the experiment, once pathology has been established (total = 8 measurements)

VI. Restraint stress

To measure the **corticosterone** stress response and subsequent recovery, animals will be exposed to 25 min restraint stress in plastic restrainers. Plasma will be extracted from blood samples (10 µL) that are collected by tail bleed at four time points: under basal conditions, at 25 min (i.e., immediately when removed from the restrainer), 75 min, and 120 min following stress initiation. This exact protocol has been used before to show abnormal corticosterone responding to stress in PTSD [REDACTED] animals (1), and correlational analyses with the brain findings will inform us on the neural basis of these changes.

[REDACTED]

VIII. Sacrifice

For histological read-out of neuronal projections, animals will be sacrificed by an overdose of anesthesia followed by transcardial perfusion with saline and fixative. The total duration of the experiment will be maximally 3 months.

APPROACH II:

Animals will only be exposed to step I (Intracranial injection) and step VIII (Sacrifice) of the procedures described for Approach I.

References

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]
4. [REDACTED]
5. Panagioti M, Gooding P, Tarrier N (2009). Post-traumatic stress disorder and suicidal behavior: a narrative review. *Clin Psychol Rev* 29: 471–482.
6. Najt P, Fusar-Poli P, Brambilla P (2011). Co-occurring mental and substance abuse disorders: A review on the potential predictors and clinical outcomes. *Psychiatry Res* 186: 159–164.
7. Blanchard DC, Blanchard RJ, Tom P, Rodgers RJ (1990) Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology* 101: 511–518.
8. Blanchard RJ, Blanchard DC (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103: 70–82.
9. Adamec RE, Shallow T (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav* 54: 101–109.
10. American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV)* (Washington, DC, American Psychiatric).

11. Grillon C, Morgan CA, Southwick SM, Davis M, Charney DS (1996). Baseline startle amplitude and prepulse inhibition in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 64: 169–178.
12. Neufeld-Cohen A, Tsoory MM, Evans AK, Getselter D, Gil S, Lowry CA, Vale WW, Chen A (2010). A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19020–19025.
13. Njung'e K, Handley SL (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 38(1): 63-67.
14. Sztainberg Y, Kuperman Y, Justice N, Chen A (2011). An anxiolytic role for CRF receptor type 1 in the globus pallidus. *J Neurosci* 48: 17416–17424.
- 15. Het S, Schoofs D, Rohleder N, Wolf OT (2012). Stress-induced cortisol level elevations are associated with reduced negative affect after stress: indications for a mood-buffering cortisol effect. *Psychosom Med* 74(1): 23-32.**
- 16. Hermans EJ, Henckens MJ, Joëls M, Fernández G (2014). Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. *Trends Neurosci* 37(6): 304-14.**
17. Yehuda R (2001). Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 17: 41-46.
18. Daskalakis NP, Lehrner A, Yehuda R (2013). Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42(3): 503-513.
19. Schelling G, Briegel J, Roozendaal B, Stoll C, Rothenhäusler HB, Kapfhammer HP (2001). The effect of stress doses of hydrocortisone during septic shock on posttraumatic stress disorder in survivors. *Biol Psychiatry* 50(12): 978-985.
20. Zohar J, Yahalom H, Kozlovsky N, Cwikel-Hamzany S, Matar MA, Kaplan Z, Yehuda R, Cohen H (2011). High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(11): 796-809.

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

Below one can find a description of the number of animals requested for the execution of these experiments. However, as described before, we will only pursue these experiments when the experiments in part A have provided clear leads to these manipulations. Therefore, only a subset of the requested animals will be used.

Moreover, when Approach II will be suited/sufficient to answer our research question (i.e., the function of which neuronal circuits is associated with PTSD-susceptibility), we will implement this approach to use a minimum amount of animals.

Furthermore, we will only pursue the most promising neuronal subpopulation for research question #2 as identified in Part A of the proposal, which could either be targeted by labeling active/plastic neurons over the entire PTSD-induction procedure (A.2.A), or over the trauma or [REDACTED] period specifically (A.2.B).

Finally, as mentioned before in Part A, we will explore the option of correlational analyses on the data acquired of all animals, instead of taking into account the extreme phenotypes only. This would potentially reduce the amount of animals needed.

APPROACH I:

For now, we estimate that we need maximally 12 mice per group. We will calculate the precise group sizes per experiment using a power analyses,

based on data collected so far by us and others (also exploring correlational analyses). As only 25% of all trauma-exposed animals is expected to either display a PTSD-like phenotype or ██████████ phenotype, we have to expose 48 mice per group to end up with these group sizes.

The following groups, as introduced in the project proposal, will be assessed:

- ██████████
1. PTSD-induction ██████████ at baseline (question #1)
 2. PTSD-induction ██████████ at trauma+██████████ (question #2a1)
or PTSD-induction ██████████ at trauma (question #2a2)
or PTSD-induction ██████████ (question #2a2)
 3. PTSD-induction ██████████ at end (question #3)
= 3x 48 mice, is 144 mice.

Furthermore, to be able to specifically identify the neuronal circuits related to the trauma/██████████ exposure (instead of to e.g., ██████████ or novelty induced stress) also 12 control animals will be included for group 2, which are not exposed to PTSD-induction, but do receive the injection. Moreover, the inclusion of these control animals will inform us about the adaptive (adequate) neuronal circuit response to the trauma/██████████ in the ██████████ animals. This all adds up to ██████████ in total.

- ██████████
4. PTSD-induction ██████████ at baseline (question #1)
 5. PTSD-induction ██████████ at trauma ██████████ (question #2a1)
or PTSD-induction ██████████ at trauma (question #2a2)
or PTSD-induction ██████████ (question #2a2)
 6. PTSD-induction ██████████ at end (question #3)

= 3x 48 mice, is 144 mice.

Furthermore, to be able to specifically identify the neuronal circuits related to the trauma/██████████ exposure (instead of to e.g., ██████████ or novelty induced stress) also 12 control animals will be included for group 5, which are not exposed to PTSD-induction, but do receive the injection. Moreover, the inclusion of these control animals will inform us about the adaptive (adequate) neuronal circuit response to the trauma ██████████ in the ██████████ animals. This all adds up to ██████████ mice in total.

APPROACH II:

Alternatively, we will implement approach II, for which we also estimate to need 12 mice per group. We will calculate the precise group sizes per experiment using a power analysis, based on data collected so far by us and others. However, for this approach no categorization as PTSD-like or ██████████ will be necessary, and 12 animals per group will be sufficient. Based on the findings of the experiments described in Part A of this proposal, we will use the corresponding transgenic mouse line to do these experiments. We have the following transgenic mouse lines available which are suitable for approach II:

- *PV-Cre (parvalbumin (GABAergic) neurons)
- *SS-Cre (somatostatin (GABAergic) neurons)
- *Nex-Cre (glutamatergic neurons)
- *Dlx5/6-Cre (GABAergic neurons)
- *ePet-Cre (serotonergic neurons)
- *Dat-Cre (dopaminergic neurons)
- *Slc6a2-Cre (noradrenergic neurons)
- *Ntsr1-Cre (neurotensin receptor neurons)
- *Drd3-Cre (dopamine receptor neurons)
- *CRFR1-Cre (CRF receptor 1 neurons)
- *CRFR2-Cre (CRF receptor 2 neurons)

Since Part A of the proposal describes 6 separate experiments, with 6 potentially promising and distinct outcomes, we will maximally need $6 * 12 = 72$ mice for this approach.

Thus, depending on the results of Part A of the proposal we will need maximally 312 mice when pursuing approach I, and maximally 72 mice when pursuing approach II.

B. The animals

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

APPROACH I:

The mouse is the lowest animal species in which we are able to model human psychiatric disorders. Because of the complexity of the brain and symptomatology to diagnose these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In comparison with humans, the mouse offers the possibility to precisely control environmental conditions, such as the timing and type of trauma exposure, and all pre-, peri-, and post-trauma factors potentially influencing an eventual disease outcome. This is not possible in humans.

Moreover, the proposed PTSD-protocol has been validated in mice. Here, we propose to use mice from two specific transgenic mouse lines; [REDACTED]

[REDACTED] Both transgenic lines label a distinct set of neurons and have their own characteristics in terms of selectivity (background labeling) and sensitivity ([REDACTED]), and therefore of added value to each other. Moreover, PTSD in human patients has been linked to both abnormal neural activity (3,4) and connectivity - reflecting plasticity - (5,6), making it necessary to target both processes independently.

APPROACH II:

The mouse is the lowest animal species which brain still resembles the human brain in terms of functional and structural connectivity. Therefore, they are also the lowest animal species in which the proposed neuronal tracing studies can be performed. Moreover, the transgenic mouse lines are chosen for their specific expression of the Cre-recombinase enzyme in the neuronal population of interest, allowing us to target these specific subclasses of neurons specifically. These models are also unprecedented.

References:

1. [REDACTED]
2. Root CM, Denny CA, Hen R, Axel R (2014). The participation of cortical amygdala in innate odour-driven behaviour. *Nature* 515: 269-275.
3. Bremner JD (2002). Neuroimaging studies in post-traumatic stress disorder. *Curr Psychiatry Rep* 4: 254-263.
4. Shin LM, Rauch SL, Pitman RK (2006). Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci* 1071: 67-79.
5. Peterson A, Thome J, Frewen P, Lanius RA (2014). Resting-state neuroimaging studies: a new way of identifying differences and similarities among anxiety disorders? *Can J Psychiatry* 59(6): 294-300.
6. Kim MJ, *et al.* (2011). The structural and functional connectivity of the amygdala: from normal emotion to pathological anxiety. *Behav Brain Res* 223(2): 403-410.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	own breeding	312	adult (> 8 weeks old)

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

Approach I: The mouse is the lowest animal species in which we are able to model human psychiatric disorders. Because of the complexity of the brain and symptomatology to diagnose these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In comparison with humans, the mouse offers the possibility to precisely control environmental conditions, such as the timing and type of trauma exposure, and all pre-, peri-, and post-trauma factors potentially influencing an eventual disease outcome. This is not possible in humans. *Approach II:* The mouse is the lowest animal species in which we are able to perform neuronal tracing studies, as its structural connectivity patterns resemble those of the human brain. This is not possible in other models.

Reduction

Approach I: The requested amount of animals (based on a group size of $n = 12$) is currently thought to be needed for statistical reliable conclusions and the minimal group size one can work with. As only a subset of the total amount of trauma-exposed animals will develop PTSD (25%) [REDACTED] the total group size has to be (4x) larger. However, as mentioned before, following the completion of Part A, we will explore the option of correlational analyses on the data acquired of all animals, instead of taking into account the extreme phenotypes only. This would potentially reduce the amount of animals needed. *Approach II:* However, to reduce the number of animals, we will use specific transgenic mouse lines for neuronal tracing when ever possible. These animals will only serve to define the structural projections (circuits) of a neuronal subpopulation of interest. As no behavioral assessment and categorization is required in this case, a group size of $n = 12$ will be sufficient.

Refinement

Approach I: The experiments will be carried out with the least discomfort possible. However, exposure to electrical shocks (and the discomfort caused by them) is critical to the induction of PTSD, whereas the intracranial injection is necessary for neuronal tracing and therefore unavoidable.

Approach II: However, to reduce any adverse effects as a consequence of the PTSD-induction procedure and repeated handling of the animals, we will use specific transgenic mouse lines for tracing whenever possible. These animals will only be exposed to the intracranial injection of the virus, without any further behavioral testing.

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

APPROACH I:

Analgesic will be administered both prior to surgery (intracranial injection) and one day post-surgery to prevent any pain, whereas the mice will be anesthetized during surgery using isoflurane. During recovery, animals will be monitored closely for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions.

Although the PTSD-induction procedure will be aversive to the animals, no physical adverse effects are expected. Animals will be monitored closely for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to the housing at a reverse day/night rhythm will be applied. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

APPROACH II:

Analgesic will be administered both prior to surgery (intracranial injection) and one day post-surgery to prevent any pain, whereas the mice will be anesthetized during surgery using isoflurane. During recovery, animals will be monitored closely for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions. Animals will be group housed to reduce any additional stress.

Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

N/A

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

During surgery, all animals are anesthetized using isoflurane (inhalation).

All animals will receive a subcutaneous injection of buprenorphine (0.2 mg/kg) half an hour prior to the start of surgery, as well as the next morning (post-surgery). This analgesic is chosen for its long lasting analgesic effects, and repeated (2x) administration is therefore expected to be sufficient to reduce pain. Nevertheless, all animals will be daily checked for a week during recovery to monitor any symptoms of discomfort.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

APPROACH I: The mice will experience severe discomfort during the PTSD-induction procedure, moderate stress during the restraint stress session, mild discomfort due to the [REDACTED] and tail blood collection, and very mild psychological discomfort in the behavioral tests assessing basal anxiety and PTSD phenotype (due to light, novelty, or temporary single housing to assess their activity in the light phase). However, none of these potential stressors are associated with physical damage to the animals. Moreover, they will experience moderate stress from the surgery due to the anesthesia.

APPROACH II: The mice will experience moderate stress from the surgery due to the anesthesia.

Explain why these effects may emerge.

The cause of the stress of the mice is either primarily physical in nature (in case of surgery, foot shock, restraint stress, and blood sampling), or novelty/light-induced (in case of behavioral testing). These stressors are however necessary for these experiments to succeed.

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

Although some stressors are inherent to the experimental design, we will take precautionary measures to minimize all other potential causes of (additional) stress to the animals, e.g., by using analgesics and anesthetics, habituation to reverse cycle housing, and only partial cleaning of the housing cages to retain hierarchy (and thereby prevent fighting to re-establish this hierarchy). Moreover, i.p. injections and all other procedures will only be performed by experienced researchers to minimize stress.

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.

No side effect of the intracranial injection procedure are expected.

The criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one day is considered as a humane endpoint. Also (a combination of) general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), and poor coat conditions are considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized.

*Standard human endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

It is unexpected that any of the animals reach the human end point over the course of the experiment. So far, the primary researcher has exposed ~120 mice to the PTSD-induction protocol without witnessing any physical adverse effects. Also intracranial injections have been executed dozens of times by the primary researcher without any major side effects. The human endpoint was only applied once in these experiments (after consulting a veterinary), when a mouse was sacrificed because it suffered from severe wounds from excessive fighting with a dominant cage mate, but this occurred prior to PTSD-induction and was thus unrelated to the proposed paradigm.

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).

APPROACH I:

The total (cumulative) discomfort of the animals is expected to be severe.

APPROACH II:

The total (cumulative) discomfort of the animals is expected to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The brains of the animals are needed to analyse the neuronal circuits labeled that are associated with PTSD-development (questions #1-3); this is in fact the primary outcome measure of Part B.

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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	Serial number 3	Type of animal procedure C. Manipulation of PTSD-associated neuronal circuits

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.

General design

To manipulate the identified neuronal circuits (in Part B) we will make use of optogenetics, a technique in which the activity of genetically modified neuronal populations can be manipulated by light. Depending on the results of Part B of this proposal, we will follow one of two approaches. Firstly (Approach I), we can sensitize our neuronal population of interest to light by the intracranial injection of a viral vector expressing the opsin, in transgenic mouse lines expressing Cre-recombinase in our neuronal population of interest. This approach has the major benefit of site-specific expression of the opsin, without any confounding expression elsewhere in the brain. However, it will require a substantial amount of neurons to be affected, so if the neuronal subpopulation of target (as identified in Part A of the proposal) is only sparsely present (or suboptimally targeted by viral injection), this approach will be not optimal and we will refer to another approach. The second approach (Approach II) is the sensitization of our neuronal population of interest to light by crossbreeding conditional channelrhodopsin (ChR2) and archaerhodopsin (Arch) mice with the transgenic Cre-lines for our neuronal population of interest. In this scenario, all Cre-expressing neurons throughout the brain will express the opsin - ensuring optimal sensitivity - but this goes at the cost of selectivity. Depending on the results from Part A & B of this proposal we will choose the most optimal approach for targeting our neuronal circuits of interest. In general, if the neuronal subpopulation and projection sites (i.e. circuit) are very widespread, approach I will be preferred to ensure specificity of the manipulation. When they are very locally focused, approach II is preferred.

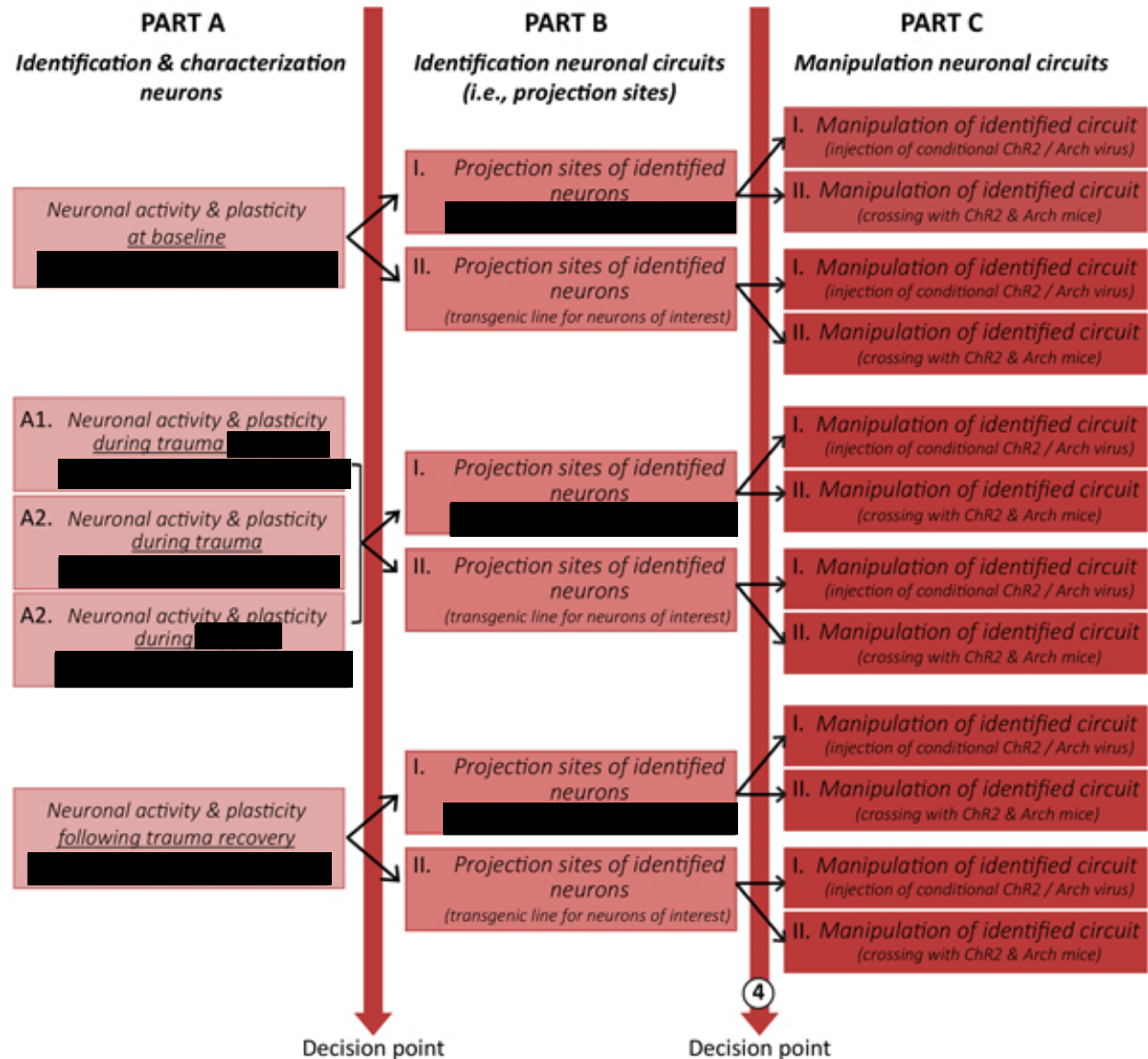
Once we have established a neuronal subpopulation sensitized to light, we will need to implant optic fibers for local light delivery.

Targeting the neuronal circuits associated with PTSD, we will try to mimic the [REDACTED] brain either at baseline (question #1), immediately following trauma exposure (question #2), or following recovery (question #3), to see if we can treat the mice and reduce the PTSD-like phenotype.

Experimental question #1:
Which neuronal circuit function at baseline is predictive of PTSD-development?

Experimental question #2:
Which neuronal circuit response to trauma exposure predicts PTSD-development?

Experimental question #3:
Which neuronal circuit function is associated with PTSD-pathology and resiliency following trauma recovery?



Decision point:

④ In case the neurons whose circuit will be manipulated in Part C are highly abundant and focally concentrated, we will follow approach I and intracranially inject them for local opsin expression; if this is not the case, the offspring will be tested of the mouse line used for Part B of the proposal crossed with conditional ChR2 and Arch mice, to ensure sufficient levels of opsin expression

Figure 6. Experimental design of Part C.

Primary outcome measures

- Behavioral phenotype; [REDACTED]
- Neuroendocrine function; [REDACTED]
- Potential reduction in PTSD-incidence following photostimulation at baseline (question #1)
- Potential reduction in PTSD-incidence following photostimulation after trauma & trigger exposure (question #2)
- Potential reduction in PTSD-like symptoms following photostimulation after recovery (question #3)

Justification

The set of behavioral output measures is critical for the classification of animals [REDACTED] PTSD-[REDACTED]. Moreover, since neuroendocrine abnormalities are associated with PTSD, we include these measures as well to try to associate them with a potential reduction in PTSD-like phenotype. Optogenetic manipulation is necessary to provide causal evidence for the link between the abnormal function of the identified neuronal circuits and PTSD-incidence following trauma-exposure. These manipulations will provide us ultimately with tools to either prevent, immediately treat (and thereby prevent), and treat PTSD.

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

I. Surgery: Fiberoptic placement (Approach I & II) and intracranial injection of virus (Approach I)

At the start of the experiment, transgenic mice will undergo surgery, for which they will receive analgesics (buprenorphine, subcutaneously injected) followed by inhalation of isoflurane anesthesia. During surgery, mice will be intracranially injected in the region of interest with an AAV-virus encoding a Cre-dependent opsin (either ChR2 or Arch) in Approach I, but not in Approach II. Briefly, mice will be positioned on a stereotaxic instrument and a midline incision is made across the top of the skull, the periosteum is cleaned, and the brain is leveled. Cold virus will be injected using a Hamilton syringe connected to a motorized nanoinjector. To allow diffusion of the solution into the brain tissue, the needle is left for an additional 5 min after the injection, and then very slowly removed.

All animals will be implanted with 2 fiberoptic cannula's for local light delivery. In Approach I, this will happen immediately following the viral injection. In Approach II, the preparation of the animal will be exactly the same as described for Approach I. Two fiberoptic cannula's will be slowly inserted in the brain, and are secured using the C&B-Metabond kit and Jet acrylic dental cement.

Following surgery, mice are allowed to recover for a week, and will be daily checked for symptoms of discomfort. They will receive a second dose of analgesic (buprenorphine, subcutaneously injected) 1 day after the surgery.

II. Basal anxiety

Open Field Test.

To assess basal anxiety, mice will be tested in the open field test. This test is based on the animals' natural conflict between exploration of and the aversion against open, bright areas. The open field apparatus consists of a white Plexiglas box (50 x 50 x 40 cm) lightened with 120 lux. Each mouse

will be placed in the corner of the apparatus to initiate a 10 min test session. Time spent in the center (the inner 25 x 25 cm), distance traveled in the center, number of visits to the center, and total distance traveled will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by Ethovision software ([REDACTED]).

Elevated Plus Maze.

As a second test for basal anxiety, the elevated plus maze will be used, which is also makes use of the rodents' aversion of open spaces. The elevated plus maze comprises a central part (5 x 5 cm), two opposing open arms (30.5 x 5 cm), and two opposing Plexiglas closed arms (30.5 x 5 x 15 cm), elevated at a height of 53.5 cm and the open arms are illuminated with 6-9 lux. Mice are placed in one of the closed arms facing the center to initiate a 5 min test session. Time spent in the open arms, distance traveled in the open arms, and number of visits to the open arms will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by Ethovision software (Noldus, Wageningen, Netherlands).

III. PTSD-induction

For these studies, male, adult mice will be exposed to a well-established mouse PTSD model (([REDACTED])) to induce a PTSD-like phenotype in [REDACTED] animals. The model begins on day 1, [REDACTED], in which mice receive 14 shocks of 1 mA, 1 s in duration over 85 min at variable intervals, representing the "trauma". [REDACTED]

IV. Behavioral tests for PTSD identification (phenotyping)

Mice are tested in five behavioral tests to determine whether they developed PTSD, each assessing different aspects of PTSD-symptomatology: [REDACTED]

[REDACTED] Moreover, to answer research question #3, i.e., whether we can treat PTSD and reduce its symptoms, part of the animals will be retested in these behavioral tasks following the manipulation.

Percentage risk assessment.

One of the features of PTSD tested for is the impairment in risk assessment. In PTSD patients this dysfunction often manifests itself as paranoia (4) and risky behavior demonstrated by high incidences of violence, drug abuse, or suicide (5,6). The PTSD-like mice also show risk assessment patterns consistent with an immediate or imminent danger in the face of a predator and not to an uncertain potential for risk. Mice normally engage in oriented information-gathering scanning from place of concealment and increases in stretch attend posture (7,8) in the absence of a predator, but in the presence of a predator this activity is reduced in favor of quick flight. Increased risk assessment is also associated with reduced anxiety (9).

We will measure risk assessment using the dark/light transfer test (1). The test apparatus consists of a box divided by a partition into two environments: a dark covered compartment (15 x 20 x 25 cm) and a brightly illuminated (1000–1100 lux) light compartment (30 x 25 x 25 cm). The compartments are connected by a small passage in the bottom center of the partition. The mice are placed in the dark compartment to initiate a 5 minutes test session. Time spent in the light zone, number of visits to the light zone and the latency entering the light zone will be quantified using a camera mounted above the apparatus and analyzed by (). An additional arena of 3 cm lengthwise by 6 cm width-wise will be programmed into the software tracking measurements surrounding the opening of the light area. Time spent in the risk assessment area and the number of visits to the risk assessment area are measured. Percentage risk assessment time will be calculated as the amount of time spent in the risk assessment arena as a percentage of total time spent in the light area outside of the risk assessment zone. ()

Latency to peak startle amplitude and pre-pulse inhibition.

Exaggerated startle is one of the DSMIV criteria for PTSD (10), reflecting hyperarousal in patients. Moreover, impaired pre-pulse inhibition, a measure of sensorimotor gating but also a test that requires attentional processes, has been reported for PTSD (11). To assess the animals' (latency to) peak startle and the amount of pre-pulse inhibition we here use an acoustic startle protocol. The proposed protocol is similar to those reported before (1,12). Briefly, mice are placed in a small Plexiglas cage on top of a vibration-sensitive platform in a sound-attenuated, ventilated chamber. A high-precision sensor, integrated into the measuring platform, detects movement. Two high-frequency loudspeakers inside the chamber produce all the audio stimuli. The acoustic startle response (ASR) session begins with 5 min acclimation to white background noise (70 dB) maintained through the whole session. Thirty-two startle stimuli (120 dB, 40 ms in duration with a randomly varying ITI of 12–30 s) are presented interspersed with an additional 40 startle stimuli randomly preceded by 40 ms prepulses of either 74 dB, 78 dB, or 82 dB. Maximal ASR and latency to peak startle amplitude are measured both in response to individually presented startle stimuli and in response to startle stimuli preceded by pre-pulses. Percentage pre-pulse inhibition (PPI) will be calculated as the percent difference between the maximal ASR (max G) to startle stimuli preceded by pre-pulses compared to that without. ()

Marble burying.

Marble burying was assessed to measure hypervigilance and overall anxiety in the animals (13). Mice are placed in a compartment illuminated by 10 lux with dimensions (30 × 27 × 26 cm) containing 5 cm autoclaved bedding with 20 marbles centrally arranged 4 by 5. Mice are then filmed for 25 min. Videos are scored by counting the number of unburied marbles every 5 minutes until the end of the test (14). ()

Homecage locomotion.

Homecage locomotion is assessed using the observation (Phenotyper) cages. Mice are housed individually for 72 h, in which the first 24 h are considered habituation to the individual housing conditions. Measurements of general locomotion consist of two light and two dark cycles in the last 48 h collected at 10 min intervals (1). ()

(). This test models the sleeping problems PTSD patients suffer from (10). Most patients will reach a clinical setting initially due to insomnia or disturbing nightmares, which to date have no specific cure.

Evaluation of [REDACTED]

V. Assessment of neuroendocrine function

Based on the **suggested role for corticosterone in stress recovery (15,16) and the** observation of neuroendocrine abnormalities in PTSD-patients, be it either in basal state or following a challenge (17,18), we will also monitor neuroendocrine function in PTSD-[REDACTED] mice over the course of PTSD-development, and later correlate these measures with neuronal activation. This will inform us on the potential causal relationship between neuroendocrine signaling and brain function and the supposed potential of corticosterone administration as treatment for PTSD (19,20). Therefore, corticosterone levels will be assessed by tail bleed (10 μ L) 12 times over the course of the experiment.

- Two repetitions of basal corticosterone measurements in the morning (at the circadian peak) and evening (at the circadian trough); both at the start and at the end of the experiment (total = 8 measurements)
- Stress response corticosterone levels will be assessed in response to trauma and [REDACTED] (total = 2 measurements)
- Stress response corticosterone levels will be assessed in response to restraint stress; both at the start and at the end of the experiment, once pathology has been established (total = 8 measurements)

VI. Restraint stress

To measure the corticosterone stress response and subsequent recovery, animals will be exposed to 25 min restraint stress in plastic restrainers. Plasma will be extracted from blood samples (10 μ L) that are collected by tail bleed at four time points: under basal conditions, at 25 min (i.e., immediately when removed from the restrainer), 75 min, and 120 min following stress initiation. This exact protocol has been used before to show abnormal corticosterone responding to stress in PTSD-like animals (1), and correlational analyses with the brain findings will inform us on the neural basis of these changes.

VII.

VIII. Optogenetic photostimulation

To manipulate the activity and signaling of neuronal circuits of interest, we will apply photostimulation for each experimental group at different time points throughout the experimental paradigm (see statistics section for the exact groups and manipulation). Mice will either receive photostimulation at baseline (question #1), immediately following PTSD-induction (question #2), or following recovery (question #3). For questions #1 & #2 the incidence of PTSD-development of mice receiving photostimulation will be the main output measure and will be compared with a control group to determine the effects of photostimulation. For question #3, mice will first be phenotyped [REDACTED] PTSD-[REDACTED] and subsequently subjected to photostimulation. Then, mice will be retested in the behavioral paradigm, to see whether PTSD-symptomatology in the PTSD-[REDACTED] animals was reduced or PTSD-incidence decreased as a consequence of photostimulation. A control group will be included to control for the effects of time and repeated testing. In all cases, the experimental group exists of animals expressing the opsin and are thus sensitive to photostimulation, whereas the control group exists of their littermates, which are undergoing the exact same procedures, but are not expressing the opsin - since they have a different genotype - and are thus insensitive to photostimulation.

VIV. Sacrifice

For histological read-out of neuronal projections, animals will be sacrificed by an overdose of anesthesia followed by transcordial perfusion with saline and fixative. The total duration of the experiment will be maximally 3 months.

References

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]
3. [REDACTED]
4. [REDACTED]
5. Panagioti M, Gooding P, Tarrier N (2009). Post-traumatic stress disorder and suicidal behavior: a narrative review. *Clin Psychol Rev* 29: 471–482.
6. Najt P, Fusar-Poli P, Brambilla P (2011). Co-occurring mental and substance abuse disorders: A review on the potential predictors and clinical outcomes. *Psychiatry Res* 186: 159–164.
7. Blanchard DC, Blanchard RJ, Tom P, Rodgers RJ (1990) Diazepam changes risk assessment in an anxiety/defense test battery. *Psychopharmacology* 101: 511–518.
8. Blanchard RJ, Blanchard DC (1989). Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol* 103: 70–82.
9. Adamec RE, Shallow T (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiol Behav* 54: 101–109.
10. American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM IV)* (Washington, DC, American Psychiatric).
11. Grillon C, Morgan CA, Southwick SM, Davis M, Charney DS (1996). Baseline startle amplitude and prepulse inhibition in Vietnam veterans with posttraumatic stress disorder. *Psychiatry Res* 64: 169–178.
12. Neufeld-Cohen A, Tsoory MM, Evans AK, Getselter D, Gil S, Lowry CA, Vale WW, Chen A (2010). A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19020–19025.
13. Njung'e K, Handley SL (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 38(1): 63-67.
14. Sztainberg Y, Kuperman Y, Justice N, Chen A (2011). An anxiolytic role for CRF receptor type 1 in the globus pallidus. *J Neurosci* 48: 17416–17424.

15. Het S, Schoofs D, Rohleder N, Wolf OT (2012). Stress-induced cortisol level elevations are associated with reduced negative affect after stress: indications for a mood-buffering cortisol effect. *Psychosom Med* 74(1): 23-32.

16. [REDACTED]

17. Yehuda R (2001). Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry* 62 Suppl 17: 41-46.

18. Daskalakis NP, Lehrner A, Yehuda R (2013). Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42(3): 503-513.

19. Schelling G, Briegel J, Roozendaal B, Stoll C, Rothenhäusler HB, Kapfhammer HP (2001). The effect of stress doses of hydrocortisone during septic shock on posttraumatic stress disorder in survivors. *Biol Psychiatry* 50(12): 978-985.

20. Zohar J, Yahalom H, Kozlovsky N, Cwikel-Hamzany S, Matar MA, Kaplan Z, Yehuda R, Cohen H (2011). High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(11): 796-809.

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

Below one can find a description of the number of animals requested for the execution of these experiments. However, as described before, we will only pursue these experiments in the most promising groups, based on the results of the experiments described in Part A & B of this proposal. Therefore, only a subset of the requested animals will be used.

As mentioned before in Part A, we will explore the option of correlational analyses on the data acquired of all animals, instead of taking into account the extreme phenotypes only. This would potentially reduce the amount of animals needed.

For now, we estimate that we need maximally 12 mice per group. We will calculate the precise group sizes per experiment using a power analyses, based on data collected so far by us and others (also exploring correlational analyses). As only 25% of all trauma-exposed animals is expected to either display a PTSD [REDACTED] phenotype or [REDACTED] phenotype, we have to expose 48 mice per group to end up with these group sizes.

To determine the effects of neuronal circuit (de)activation, we will compare the incidence of PTSD and PTSD-symptomatology in an experimental group with that of a control group. Therefore, double the amount of animals (n = 96) is necessary to determine the effect of our manipulation.

The following groups could be assessed to answer experimental question #1, and will receive (repeated) photostimulation at baseline:

1. [REDACTED]

2. [REDACTED]

or:

3. Specific transgenic line (as specified in Part B of the proposal) targeting aberrant neuronal circuit activation (as identified initially in the [REDACTED] mice) associated with PTSD

(PV-Cre, SS-Cre, Nex-Cre, Dlx5/6-Cre, ePet-Cre, Dat-Cre, Slc6a2-Cre, Ntsr1-Cre, Drd3-Cre, CRFR1-Cre, CRFR2-Cre)

4. Specific transgenic line (as specified in Part B of the proposal) targeting aberrant neuronal circuit plasticity (as identified initially in the [redacted] mice) associated with PTSD

(PV-Cre, SS-Cre, Nex-Cre, Dlx5/6-Cre, ePet-Cre, Dat-Cre, Slc6a2-Cre, Ntsr1-Cre, Drd3-Cre, CRFR1-Cre, CRFR2-Cre)

adding up to $2*96 = 192$ mice to answer experimental question #1.

The following groups could be assessed to answer experimental question #2, and will receive photostimulation immediately following PTSD-induction:

5. Specific transgenic line (as specified in Part B of the proposal) targeting aberrant neuronal circuit activation associated with PTSD (PV-Cre, SS-Cre, Nex-Cre, Dlx5/6-Cre, ePet-Cre, Dat-Cre, Slc6a2-Cre, Ntsr1-Cre, Drd3-Cre, CRFR1-Cre, CRFR2-Cre)

6. Specific transgenic line (as specified in Part B of the proposal) targeting aberrant neuronal circuit plasticity associated with PTSD (PV-Cre, SS-Cre, Nex-Cre, Dlx5/6-Cre, ePet-Cre, Dat-Cre, Slc6a2-Cre, Ntsr1-Cre, Drd3-Cre, CRFR1-Cre, CRFR2-Cre)

Alternatively, if it is the case that certain neuronal subpopulations displaying aberrant activity and/or plasticity during the trauma or trigger session are best predictive of later PTSD-development, but cannot be captured by one of the listed transgenic lines (groups 5 & 6) we will also target these neuronal circuits in a later stage of PTSD development to reduce PTSD-symptomatology:

7. [redacted] prior to PTSD induction
[redacted] prior to trauma exposure

8. [redacted] prior to PTSD induction
[redacted] prior to trauma exposure

adding up to maximally $2*96 = 192$ mice to answer experimental question #2.

The following groups could be assessed to answer experimental question #3, and will receive (repeated) photostimulation following recovery:

13. [redacted] after recovery

14. [redacted] after recovery

or:

15. Specific transgenic line (as specified in Part B of the proposal) targeting aberrant neuronal circuit activation associated with PTSD (PV-Cre, SS-Cre, Nex-Cre, Dlx5/6-Cre, ePet-Cre, Dat-Cre, Slc6a2-Cre, Ntsr1-Cre, Drd3-Cre, CRFR1-Cre, CRFR2-Cre)

16. Specific transgenic line (as specified in Part B of the proposal) targeting aberrant neuronal circuit plasticity associated with PTSD (PV-Cre, SS-Cre, Nex-Cre, Dlx5/6-Cre, ePet-Cre, Dat-Cre, Slc6a2-Cre, Ntsr1-Cre, Drd3-Cre, CRFR1-Cre, CRFR2-Cre)

adding up to $2*96 = 192$ mice to answer experimental question #3.

In total, this adds up to maximally $(192+192+192 =) 576$ mice

B. The animals

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

The mouse is the lowest animal species in which we are able to model human psychiatric disorders. Because of the complexity of the brain and symptomatology to diagnose these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In comparison with humans, the mouse offers the possibility to precisely control environmental conditions, such as the timing and type of trauma exposure, and all pre-, peri-, and post-trauma factors potentially influencing an eventual disease outcome. This is not possible in humans.

Moreover, the proposed PTSD-protocol has been validated in mice. Lastly, optogenetic manipulation of specific neuronal circuits (characterized by a certain neuronal marker or activity) is by far best developed in this model system, offering a wide variety of transgenic animals one can work with.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Mouse	own breeding	576	adult (>8 weeks old)

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 mouse is the lowest animal species in which we are able to model human psychiatric disorders. Because of the complexity of the brain and symptomatology to diagnose these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In comparison with humans, the mouse offers the possibility to precisely control environmental conditions, such as the timing and type of trauma exposure, and all pre-, peri-, and post-trauma factors potentially influencing an eventual disease outcome. This is not possible in humans.

Moreover, the proposed PTSD-protocol has been validated in mice. Lastly, optogenetic manipulation of specific neuronal circuits (characterized by a certain neuronal marker or activity) is by far best developed in this model system, offering a wide variety of transgenic animals one can work with.

Reduction

The requested amount of animals (based on a group size of $n = 12$) is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. As only a subset of the total amount of trauma-exposed animals will develop PTSD (25%) and [REDACTED] the total group size has to be (4x) larger. However, as mentioned before, following the completion of Part A, we will explore the option of correlational analyses on the data acquired of all animals, instead of taking into account the extreme phenotypes only. This would potentially reduce the amount of animals needed.

Refinement

The experiments will be carried out with the least discomfort possible. However, the exposure to electrical shocks (and the discomfort caused by them) is critical to the induction of PTSD, whereas surgery is required for our manipulation and therefore unavoidable.

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

Analgesic will be administered both prior to surgery (intracranial injection and implantation of the optic fibers) and one day after, to prevent any pain, whereas the mice will be anesthetized during surgery using isoflurane. During recovery, animals will be monitored closely for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions.

Although the PTSD-induction procedure will be aversive to the animals, no physical adverse effects are expected. Animals will be monitored closely for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals. Also, habituation to the housing at a reverse day/night rhythm will be applied. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

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.

During surgery, all animals are anesthetized using isoflurane (inhalation).

All animals will receive a subcutaneous injection of buprenorphine (0.2 mg/kg) half an hour prior to the start of surgery, as well as the next morning (post-surgery). This analgesic is chosen for its long lasting analgesic effects, and repeated (2x) administration is therefore expected to be sufficient to reduce pain. Nevertheless, all animals will be daily checked during recovery to monitor any symptoms of discomfort.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The mice will experience moderate discomfort from the surgery due to the anesthesia.

The mice will experience severe discomfort during the PTSD-induction procedure, moderate stress during the restraint stress session, mild discomfort due to the evt. [REDACTED] and tail blood collection, and very mild psychological discomfort in the behavioral tests assessing basal anxiety and PTSD phenotype (due to light, novelty, or temporary single housing to assess their activity in the light phase). However, none of these potential stressors are associated with physical damage to the animals.

Explain why these effects may emerge.

The cause of the stress of the mice is either primarily physical in nature (in case of surgery, foot shock, restraint stress, and blood sampling), or novelty/light-induced (in case of behavioral testing). These stressors are however absolutely necessary for these experiments to succeed.

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

Although some stressors are inherent to the experimental design, we will take precautionary measures to minimize all other potential causes of (additional) stress to the animals, e.g., by using analgesics and anesthetics, habituation to reverse cycle housing, and only partial cleaning of the housing cages to retain hierarchy (and thereby prevent fighting to re-establish this hierarchy). Moreover, i.p. injections and all other procedures will only be performed by experienced researchers to minimize stress.

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.

No side effects of the intracranial injection and fiberoptic cannula placement are expected.

The criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one day is considered as a humane endpoint. Also (a combination of) general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), and poor coat conditions are considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized.

*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

It is unexpected that any of the animals reach the human end point over the course of the experiment. So far, the primary researcher has exposed ~120 mice to the PTSD-induction protocol without witnessing any physical adverse effects. Also intracranial injections and fiberoptic surgeries have been executed dozens of times by the primary researcher without any major side effects.

The humane endpoint was only applied once in these experiments (after consulting a veterinary), when a mouse was sacrificed because it suffered from severe wounds from excessive fighting with a dominant cage mate, but this occurred prior to PTSD-induction and was thus unrelated to the proposed paradigm.

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 total (cumulative) discomfort of the animals is expected to be severe.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The brains of the animals are needed for histological read-out of neuronal activation and opsin expression.

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 2015-0090
2. Titel van het project: Neural correlates of post-traumatic stress disorder: natural resilience as key for intervention
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar de hersenkenmerken die beschermen tegen post-traumatische stress stoornis
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - Naam DEC: RUDEC
 - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
 - ontvangen door DEC: 22-09-2015
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 06-10-2015 en 03-11-2015
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 12-10-2015 tot 20-10-2015 en van 09-11-2015 tot 11-11-2015
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 20-10-2015 en 11-11-2015
 - advies aan CCD: 24-11-2015
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: 12-10-2015
 - Strekking van de vragen:
 - Niet-technische samenvatting:**
 - Deze NTS voldoet niet aan de gestelde criteria. De inhoud zou moeten aansluiten bij de fundamentele insteek van het project en minder speculeren over de mogelijke translationele waarde. Het taalgebruik is te ingewikkeld voor de doelgroep.
 - 3.4 De vermelding van alleen 'milde' schokken is een onjuiste voorstelling van zaken voor een model dat de DEC als ernstig ongerief beschouwt.

-3.5 De vermelding van het cumulatieve ongerief voor de dieren ontbreekt. De beschrijving van het ongerief per handeling wordt hier gegeven maar is niet gevraagd.

Project Proposal:

-Er staat een storende spelfout in de hele aanvraag. De onderzoekers worden verzocht inedible te vervangen door indelible.

-3.1 Er bestaan vele diermodellen voor PTSS. De onderzoekers bestempelen het model dat zij willen gebruiken als 'well-established', maar twee van de drie referenties die zij geven betreffen kennelijk niet-geaccepteerde artikelen. Bovendien komt al het onderzoek uit hetzelfde laboratorium. De commissie verzoekt de onderzoekers beter te onderbouwen waarom zij dit een 'well-established' model achten, of anders deze classificatie te nuanceren.

-3.1 De gegeven achtergrond zou een verduidelijking moeten zijn van onderdeel 3.2: de doelstelling en de onderzoeksvragen van het project. De drie onderzoeksvragen zijn nog onvoldoende ingeleid bij onderdeel 3.1. Dit geldt met name voor de vragen 2 en 3. Wat is de noodzaak tot het doen van deze experimenten? Betreft het drie onafhankelijke onderzoeksvragen, of is er een verband c.q. onderlinge afhankelijkheid tussen de vragen? Wat bedoelen de onderzoekers precies met 'response to trauma exposure' en wat is het verschil met 'following trauma recovery'? Mag de DEC aannemen dat de onderzoekers hiermee niet bedoelen dat de dieren spontaan herstellen van PTSS? Zo ja, wat bedoelen zij dan wel?

-3.1 Er is een groot verschil tussen mannen en vrouwen in gevoeligheid voor PTSS: het risico op PTSS is tweemaal zo hoog bij vrouwen. Dit leidt tot uitdagingen waar het de validiteit van modellen betreft (Shansky, Neurobiol Stress 2015). Waarom willen de onderzoekers mannelijke dieren gebruiken? Indien zij menen dat dit geen consequenties heeft voor de extrapolatie van de resultaten naar de humane situatie worden zij verzocht dit duidelijk te onderbouwen.

-3.1 De fysiologie die ten grondslag ligt aan deze aanvraag is onderbelicht. Zien de onderzoekers een verband met de verschillende copingstyles in respons op stress? Welke betrokken circuits verwachten de onderzoekers mogelijk te vinden in dit project?

-3.1 De verwijzing naar de financiering van dit project is een aspect dat iets zegt over de haalbaarheid en het belang ervan in de ogen van vakgenoten, en hoort daarom bij onderdeel 3.2 en 3.3. De onderzoekers worden verzocht dit aan te passen.

-3.2 De onderzoekers worden verzocht hier alleen de doelstelling van het project inclusief de onderzoeksvragen te benoemen en dan in te gaan op de haalbaarheid van de doelstellingen. De beschrijving van de strategie (onderdelen A, B en C) hoort bij onderdeel 3.4. De laatste alinea is een beschrijving van het belang, en hoort daarom bij onderdeel 3.3.

-3.3 De onderzoekers willen met dit onderzoek een fundamentele vraag beantwoorden. Het wetenschappelijke belang hiervan is zeker zo groot als het maatschappelijke belang, maar blijft nu onderbelicht. Het onderzoek leidt mogelijk tot het identificeren van biomarkers in de hersenen die gevoeligheid voor PTSS voorspellen. Hoe kunnen deze biomarkers in de populatie bepaald worden waardoor zij van translationele waarde kunnen zijn? De onderzoekers worden verzocht dit beter te onderbouwen.

-3.4.1 Hebben de resultaten van onderzoeksvraag 1 geen invloed op het design van de experimenten om onderzoeksvraag 2 en 3 te beantwoorden? De onderzoekers worden gevraagd dit beter uit te leggen (zie ook de tweede vraag over 3.1). Tevens ziet de commissie

dit als een belangrijk go/no go moment voor de beide andere onderzoeksvragen. Zij verzoekt de onderzoekers dit op te nemen in de aanvraag of zich in eerste instantie te beperken tot onderzoeksvraag 1 en pas een vervolgaanvraag te schrijven indien er meer duidelijkheid is over de haalbaarheid en relevantie van de gekozen aanpak. De commissie heeft een voorkeur voor de tweede optie, maar houdt de mogelijkheid open dat de onderzoekers hun aanpak voldoende zullen kunnen onderbouwen om de huidige aanvraag te handhaven.

-3.4.2 Kunnen de onderzoekers met behulp van een tijdslijn per onderzoeksvraag aangeven op welk tijdstip welke handelingen zullen plaatsvinden?

-3.4.2 Uit de beschrijving van de milestones bij 3.4.3 lijkt het alsof de drie onderzoeksvragen na elkaar onderzocht zullen worden, terwijl dit niet blijkt uit figuur 1.

-3.4.2 Kunnen de onderzoekers duidelijker uitleggen hoe zij bij onderdeel A de neurobiologie gaan onderzoeken in het hersenweefsel? Welke technieken willen de onderzoekers daarvoor gebruiken, en denken zij dan ook aan in-situ hybridisatie of Q-PCR? Kunnen zij daarmee activatie of plasticiteit aantonen?

-3.4.2 Zou het misschien toch relevant kunnen zijn om onderdeel B uit te voeren indien er in onderdeel A geen specifiek gebied gevonden wordt?

-3.4.2 Kunnen de dieren na implantatie van de optische vezels zich nog voldoende vrij bewegen zonder dat dit invloed heeft op de uitkomst van de voorgesteld gedragstesten?

-3.4.3 Kunnen de onderzoekers de criteria specifiekere benoemen voor beslispunt A en beslispunt B?

Description of Animal Procedures:

-De commissie is niet akkoord met de huidige ongeriefclassificatie van de dierexperimenten. De onvermijdbare en onvoorspelbare elektrische schokken die ook nog eens gecombineerd worden met huisvesting in fel licht en lawaai geven ernstig ongerief (zie bijlage VIII van Richtlijn 2010/63/EU). Alle dieren die PTSS inductie ondergaan ondervinden derhalve ernstig ongerief, onafhankelijk van het feit of zij PTSS ontwikkelen. Dat dieren die geen PTSS ontwikkelen DUS ook de schokken als minder ernstig hebben ervaren, mag niet zonder meer geconcludeerd worden.

-DAP1 vraag A1. Waarom willen de onderzoekers zowel het trauma als de trigger bestuderen? De rationale hiervoor is onvoldoende toegelicht.

-DAP1 vraag A2, IV: de beschreven bepaling van de neuroendocriene functie is onvoldoende om een goed beeld van de neuroendocriene functie van een dier te krijgen. Bovendien is de achtergrond van deze bepaling onvoldoende beschreven in het project. De handelingen leveren wel extra ongerief voor de dieren. De onderzoekers worden verzocht de noodzaak van deze bepaling te heroverwegen, of er een zodanige bepaling van te maken dat de uitkomsten te interpreteren zijn in het kader van dit experiment.

-DAP1 vraag A2. In het project proposal onderdeel 3.4.2 staat vermeld dat er immunohistochemische experimenten worden uitgevoerd om de neurobiologie van de gelabelde cellen te onderzoeken. Deze experimenten ontbreken in deze beschrijving. Kunt u toelichten hoe u de activatie of plasticiteit d.m.v. immunohistochemie (of wellicht in situ hybridisatie of Q-PCR) kunt aantonen?

-DAP1 vraag A3. De argumentatie voor het toevoegen van 12 controledieren per experiment ontbreekt.

-DAP1 vraag D2. Tweemaal per week checken is te weinig voor een goede bepaling van humane eindpunten. Groepshuisvesting is een standaard procedure die niet speciaal wordt toegepast om het ongerief voor de dieren te verkleinen.

-DAP1 vraag J. Het humane eindpunt is gewichtsverlies van meer dan 15% in één dag (niet 15-20%). De commissie verzoekt de onderzoekers de zin 'All criteria that have been considered in the past ... t/m ... veterinarians at ██████████.weg te halen.

-DAP1 vraag K. De onderzoekers worden verzocht het cumulatief ongerief per dier in plaats van per handeling aan te geven.

De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en DAP3 en deze waar nodig aan te passen.

- Datum antwoord: 20-10-2015
- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

- We hebben de NTS aangepast aan de gestelde criteria door deze beter te laten aansluiten bij de fundamentele insteek van het project. De herziene NTS bevat ook minder speculatie over de mogelijk translationele waarde. Daarnaast is alles uitgelegd met eenvoudiger taalgebruik.

- 3.4: We hebben alle verwijzingen naar de milde aard van de schokken verwijderd uit de NTS. We bedoelden hier aanvankelijk mee te zeggen dat de elektrische schokken dusdanig van aard zijn dat ze als onprettig (stressvol) worden ervaren, zonder verdere weefselschade te veroorzaken. We zijn het echter met de commissie eens dat in psychologisch opzicht de schokken niet mild zijn en hebben deze toevoeging dan ook verwijderd uit de beschrijving.

- 3.5: Het cumulatieve ongerief voor de dieren is matig of ernstig, afhankelijk van het specifieke experiment. We hebben deze informatie toegevoegd aan de herziene NTS.

Project Proposal:

- We verontschuldigen ons voor deze ongelukkige vergissing. De spelfout is gecorrigeerd in de gehele herziene aanvraag.

- 3.1: We zijn het met de commissie eens dat er inderdaad nog maar weinig werk gepubliceerd is over het voorgestelde PTSS-protocol en dat het woord 'well-established' misschien iets te krachtig is. Desalniettemin zijn er verschillende studies uitgevoerd die de waarde van het voorgestelde PTSS-model bevestigen, waarvan verscheidene door de hoofdonderzoeker zelf (ook in een ander laboratorium). Zowel het fenotype van de PTSS-achtige dieren in het gedrag als de afwijkingen in stress hormoon secretie (die onafhankelijk zijn van de categorisatie als PTSS-vatbaar of -resistent, maar ook waargenomen worden in PTSS patiënten) zijn inmiddels meerdere keren (onafhankelijk) gerepliceerd. Daarnaast zijn andere onderzoekers in het veld dusdanig enthousiast geraakt dat ze het model ook zijn gaan gebruiken en ons benaderd hebben voor eventuele samenwerking (██████████ ██████████). We zijn er dan ook van overtuigd dat dit model het beste diermodel voor PTSS is dat we kunnen gebruiken. We hebben de frasering van 'well-established' echter aangepast en verder beargumenteerd waarom we juist dit PTSS-model willen gebruiken (onderdeel 3.1 van het herziene projectvoorstel).

- 3.1: We verontschuldigen ons voor de onduidelijkheden omtrent de onderzoeksvragen en de gebrekkige achtergrond van het project. We hebben deze sectie nu substantieel uitgebreid. De onderzoeksvragen zijn in principe onafhankelijk van elkaar, al worden ze op een soortgelijke wijze (d.w.z. met hetzelfde PTSS-model) onderzocht. Wij gaan er bij dit onderzoek vanuit dat van alle dieren die we blootstellen aan het trauma, een gedeelte volledig herstelt, en een gedeelte PTSS-achtige verschijnselen ontwikkelt (dit is in vorig onderzoek met het PTSS-model aangetoond). We zijn geïnteresseerd in de verschillen tussen deze twee groepen, en willen die onderzoeken op 3 tijdstippen. Voor onderzoeksvraag 1 gaan we op zoek naar vatbaarheidsfactoren (voorafgaand aan de blootstelling aan trauma) die de latere ontwikkeling van PTSS na een trauma kunnen voorspellen. Zo zouden uiteindelijk individuen gescreend kunnen worden op deze factoren en vatbare personen kunnen worden geëxcludeerd van risicovol werk (bijv. bij de brandweer, politie, of in het leger). Met onderzoeksvraag 2 richten we ons op kenmerken van PTSS-vatbare individuen tijdens de reactie op het trauma zelf (d.w.z. in de tijd rond de traumatische gebeurtenis). Zo zouden vatbare individuen meteen behandeld kunnen worden als ze zich in het ziekenhuis melden, om zo meteen in te grijpen en de ontwikkeling van PTSS te voorkomen. Voor onderzoeksvraag 3 richten we ons op de kenmerken van PTSS-vatbare individuen na het veronderstelde herstel van de traumatische gebeurtenis. We gaan er hierbij vanuit dat de PTSS-resistente dieren op dit tijdstip volledig hersteld zijn van het trauma, maar de PTSS-vatbare dieren nog niet (ze vertonen immers gedragsafwijkingen). In dit stadium heeft dus één groep PTSS ontwikkeld en de andere niet. Door de hersenen van deze groepen te vergelijken verkrijgen we inzicht in de pathologie van PTSS, en zo dus meer informatie over mogelijk targets voor behandeling van de aandoening. We hebben de achtergrondinformatie in onderdeel 3.1 uitgebreid om voldoende informatie te bieden voor onderdeel 3.2. Daarnaast hebben we een extra figuur (Figuur 1) opgenomen in het voorstel ter verduidelijking van de drie onderzoeksvragen.

- 3.1: We erkennen het aangestipte verschil tussen mannen en vrouwen in gevoeligheid voor PTSS. Daar staat echter tegenover dat hoewel het percentage vrouwen dat t.g.v. een trauma PTSS ontwikkelt hoger ligt, het percentage vrouwen dat daadwerkelijk een traumatische gebeurtenis meemaakt in het leven zo'n 30% lager ligt dan bij mannen (Kessler et al. 1995). Daarnaast is het type trauma's dat vrouwen meemaken (bijv. seksueel misbruik, verwaarlozing, verkrachting, etc.) van dusdanig andere aard als bij mannen (die vaker worden blootgesteld aan (niet-sexueel) geweld, rampen, verwondingen, ongelukken en getuige zijn van dood/verwondingen), dat deze trauma's vaker in PTSS resulteren (Olf et al. 2007; Santiago et al. 2013). Bovendien maken deze trauma's gewoonlijk op een jongere leeftijd mee, waarop ze vatbaarder zijn voor PTSS, en gaan ze samen met een sterkere perceptie van bedreiging en verlies van controle over de situatie (Olf et al. 2007). Er zijn studies die suggereren dat als voor deze factoren gecorrigeerd wordt en beide sexen aan soortgelijke traumatische gebeurtenissen blootgesteld worden, vrouwen en mannen een gelijke kans hebben op het ontwikkelen van PTSS (bijv. Maguen et al. 2012). De voornaamste redenen waarom wij mannelijke dieren gebruiken zijn A) omdat het voorgestelde PTSS-inductie protocol alleen gevalideerd is in mannetjes muizen, en B) om het aantal benodigde dieren zo veel mogelijk te beperken. Vanuit humaan onderzoek is namelijk bekend dat de stressgevoeligheid van vrouwen afhankelijk is van de precieze fase in hun menstruele cyclus (ze zijn gevoeliger in de premenstruele fase (Ossewaarde et al. 2010; Lustyk et al. 2012)) en

dat hun brein in deze fasen ook anders reageert op stress en stresshormonen (Ossewaarde et al. 2010). Om voor deze factoren te controleren en de bevindingen te kunnen generaliseren naar het gehele geslacht, zou daarom ten eerste de cyclus van de muizen bijgehouden moeten worden, en daarnaast 3x zoveel muizen getest moeten worden om alle punten in de cyclus te meten. Hoewel wij de vertaling van onze bevindingen naar vrouwen erg belangrijk vinden, en dit zeker in de toekomst van plan zijn te gaan testen, lijkt het ons verstandiger voor deze eerste studie te focussen op de groep met de meest stabiele stress respons, waarin het voorgestelde model reeds gevalideerd is (i.e., mannetjes). We hebben deze onderbouwing nu opgenomen in het herziene projectvoorstel (onderdeel 3.1).

- 3.1: We hebben Figuur 1 toegevoegd om meer informatie te verschaffen over de veronderstelde fysiologie en onderliggende neurale circuits van PTSS. We verwachten met name verschillen in het functioneren van het zgn. salience (emotie) netwerk en het cognitieve controle netwerk. Coping styles zijn gerelateerd aan de functie van deze netwerken, maar vrij lastig te meten in de muizen. De mate van freezing tijdens de blootstelling aan de trauma en trigger hebben we al eerder gekwantificeerd, maar bleek helaas niet informatief over de latere ontwikkeling van een PTSS-achtig fenotype in de muizen.

- 3.1: We hebben deze wijziging doorgevoerd en de verwijzing naar de financiering van het project verplaatst naar onderdeel 3.3.

- 3.2: We hebben deze wijzigingen doorgevoerd en de secties verplaatst naar de juiste onderdelen.

- 3.3: We hebben het wetenschappelijk belang van dit onderzoek verder benadrukt in de herziene versie van onderdeel 3.3. Ons doel is om biomarkers te identificeren die de gevoeligheid voor PTSS voorspellen. Dit zouden biomarkers in het brein kunnen zijn, bijv. toegenomen of afgenomen activiteit in een specifiek hersengebied, maar ook in het bloed (bijv. corticosteron niveaus). We werken samen met een andere onderzoeksafdeling die een risicogroep voor de ontwikkeling van PTSS (politieagenten) onderzoekt, en we willen onze biomarkers als eerste in deze populatie testen. Uiteraard kunnen niet exact dezelfde metingen in het humane brein worden gedaan, maar metingen van hersenactiviteit middels fMRI zijn mogelijk, en bloedwaardes zijn vrij eenvoudig vertaalbaar. Daarnaast zou men ook kunnen denken aan genetische tests, naar variatie in genen waarvan we vinden dat ze betrokken zijn bij de vatbaarheid voor PTSS (door te bepalen welke eiwitten de hersencellen met afwijkende activiteit/plasticiteit kenmerken). We hebben de onderbouwing van potentiële translationele waarde van het onderzoeksproject verder uitgebreid in sectie 3.3.

- 3.4.1: In het projectvoorstel worden 3 onderzoeksvragen (1-3) beschreven die zich allemaal op een andere tijdsperiode in de ontwikkeling van PTSS richten (zie ook het antwoord op de tweede vraag over sectie 3.1). Daarmee zijn deze onderzoeksvragen conceptueel volledig onafhankelijk van elkaar, en zijn de resultaten van onderzoeksvraag 1 niet informatief over het design of de haalbaarheid van experimenten 2 en 3. Immers, of er kenmerken zijn tijdens baseline (onderzoeksvraag 1) die latere ontwikkeling van PTSS voorspellen, staat los van mogelijke kenmerken tijdens de blootstelling aan trauma (onderzoeksvraag 2), en van de kenmerken van de uiteindelijke pathologie die zich ontwikkelt na mogelijk tekortschietend herstel (onderzoeksvraag 3).

Elke onderzoeksvraag bestaat echter uit 3 onderdelen/niveaus (A-C), die wel onderling afhankelijk van elkaar zijn. Hierin zijn wel duidelijke go/no go momenten opgebouwd; alleen

wanneer onderdeel A duidelijke aanwijzingen geeft over het precieze type hersencel die zich afwijkend gedraagt, kan onderdeel B uitgevoerd worden, en alleen als er circuits in onderdeel B geïdentificeerd zijn, kunnen deze worden gemanipuleerd in onderdeel C. We hebben de onafhankelijkheid van de onderzoeksvragen verder benadrukt in onderdeel 3.4.1 van het herziene projectvoorstel, en de afhankelijkheid van onderdelen A-C (en de go/no go momenten hierin) verder uitgewerkt door het gehele voorstel. Daarnaast is figuur 2 verplaatst naar sectie 3.4.1, om daar al meer duidelijkheid te scheppen over de opzet van het project.

- 3.4: We hebben een tijdslijn aan onderdeel 3.4.2. van het herziene voorstel toegevoegd (Figuur 3), waar we zeer globaal de tijdslijn van de verschillende experimenten aangeven.

- 3.4.2: De milestones die in onderdeel 3.4.3. beschreven staan gaan niet over de 3 verschillende onderzoeksvragen, maar over de 3 onderdelen (A-C) die ze beslaan. De onderdelen A-C zullen na elkaar onderzocht worden en alleen als het eerdere onderdeel succesvol is gebleken wordt met het volgende onderdeel gestart. We hebben onderdeel 3.4.3. aangepast om dit te verduidelijken.

- 3.4.2: De neurobiologie van het hersenweefsel (of meer specifiek; van de gelabelde cellen die afwijkende activiteit/plasticiteit vertonen) zal worden onderzocht in in-situ hybridisatie en immunohistochemie experimenten. Q-PCR zal op het hersenweefsel van de dieren gebruikt voor onderdeel A helaas niet mogelijk zijn aangezien alle breintjes perfusie-fixatie zullen ondergaan, zodat we hersenplakjes kunnen snijden die we vervolgens onder de microscoop zullen bestuderen voor de identificatie van de afwijkende hersencellen (daar zijn alle dieren voor nodig). Er zullen verschillende sets hersenplakjes worden gesneden, en de resterende sets zullen worden gebruikt voor de in-situ hybridisatie en immunohistochemie experimenten. We hebben deze nu informatie toegevoegd aan onderdeel 3.4.2.

- 3.4.2: Onderdeel B kan alleen uitgevoerd worden als een celpopulatie (en hersengebied) bekend is waarop we ons kunnen richten voor de identificatie van mogelijk afwijkende circuits. We achten het zeer onwaarschijnlijk dat er veranderingen op circuitniveau plaatsvinden zonder bijbehorende veranderingen in neuronale activiteit of plasticiteit. Echter, het nadeel van de voorgestelde transgene muislijnen (cFos-CreERT2 and Arc-CreERT2 mice) is dat de labeling een 'alles-of-niets' kleuring inhoudt, d.w.z. zodra het immediate early gene (c-Fos of Arc) aangemaakt wordt, verkleurt de cel. De methode stelt ons dus in staat afwijkende activiteit/plasticiteit te detecteren als het om verschillende aantallen cellen gaat, maar is ongevoelig voor eventuele gradaties in activiteit/plasticiteit (het niveau van c-Fos of Arc-expressie) per cel. Het zou dus eventueel mogelijk zijn dat een identiek aantal cellen activiteit/plasticiteit vertoont, maar in een verschillende mate. In dat geval zullen we in onderdeel A geen verschillen vinden, maar is het toch interessant om onderdeel B uit te voeren. Het is dan echter zaak deze cellen op een andere manier te identificeren, zodat we weten van welke cellen we het circuit moeten bepalen in onderdeel B. In dit geval zullen we een amendement indienen om onderdeel A opnieuw uit te voeren, maar waarbij we de breintjes invriezen na het offeren van de dieren om vervolgens Q-PCR experimenten uit te kunnen voeren op potentieel interessante hersengebieden. Wanneer deze experimenten dan verschillen laten zien (in c-Fos en Arc-expressie, maar bijvoorbeeld ook in andere immediate early genes of stress-gerelateerde genen) tussen de resistente en PTSS-vatbare dieren, kan het corresponderende gebied (of celtype) getarget worden voor onderdeel B.

- 3.4.2: De optische vezels die in het brein geïmplanteerd worden zijn slechts enkele mm's lang en zullen slechts minimaal uit de schedel van de muizen steken. Er zal ook geen fotostimulatie plaatsvinden tijdens de gedragstesten. Daarmee zullen de geïmplanteerde vezels dus geen invloed hebben op de bewegingsvrijheid van de muizen tijdens de gedragstesten.

-3.4.3: We hebben de criteria voor beslispunt A en B (de go/no go momenten) verder toegespitst in onderdeel 3.4.3.

Description of Animal Procedures:

- De ongeriefscore van de muizen die een PTSS-achtig fenotype ontwikkelen was reeds ingeschat als ernstig. Dit in tegenstelling tot vorige DEC-aanvragen (Ru DEC 2014-175 en Ru DEC 2014-243), waarin in het ongerief ingeschaald was op matig-ernstig. We zijn ons ervan bewust dat de herhaaldelijke blootstelling aan de elektrische schokken in een verschillende context (zoals gebeurt voor de PTSS-inductie) een ernstige mate van ongerief voor de PTSS-vatbare dieren kan opleveren aangezien het consequenties heeft op de lange termijn. We willen de commissie er echter op wijzen dat vergelijkbare elektrische schokken vaker worden toegepast in conditionerings experimenten (fear conditioning), en dat de verlichting (~100 lux) en het lawaai (~70 dB), slechts van matige intensiteit zijn, en daardoor naar verwachting slechts als mild aversief ervaren worden.

- Hoewel we meegaan met de commissie in de beoordeling van het ongerief van de dieren die PTSS-achtige verschijnselen vertonen als ernstig, leert onze ervaring met deze PTSS-inductie methode ons dat de resistente dieren zeker geen ernstig ongerief van de PTSS inductie ervaren. In eerder ingediende DEC-aanvragen (Ru DEC 2014-175 en Ru DEC 2014-243) is aan het directe ongerief van de blootstelling aan de elektrische schokken in deze groep een lagere ongeriefscore van matig ongerief toegekend, gebaseerd op de waarneming dat de meeste dieren goed herstellen van de PTSS-inductie methode en geen duidelijk fenotype ontwikkelen ten gevolge ervan. Het is belangrijk te weten dat de muizen geen enkele vorm van blijvend lichamelijk ongerief van de procedure ondervinden, en het psychisch ongerief is slechts beperkt tot de PTSS-achtige dieren. Ogenscheinlijk zien alle muizen er dan ook gezond uit, en is er niets bijzonders aan hun op te merken. Wanneer we deze ingreep (die overeenkomt met de procedures die normaliter worden toegepast tijdens fear conditioning experimenten; waaraan een matig ongerief wordt toegekend) vergeleken wordt met de impact van bijvoorbeeld operaties is deze naar onze mening zelfs verwaarloosbaar. We vragen de commissie dan ook om haar oordeel over de ongeriefscore te herzien na het verkrijgen van deze extra informatie.

- DAP1 vraag A1: We willen beginnen met het onderzoeken van de reactie op de combinatie van de trauma en trigger blootstelling zoals beschreven staat in onderzoeksvraag 2a1. De (neurale) reactie op beide gebeurtenissen zal de meest robuuste labeling veroorzaken van geactiveerde/plastische hersencellen. Echter, een dergelijk robuuste reactie en labeling tijdens beide gebeurtenissen geeft ook meer achtergrondsignaal, dat mogelijk niet relevant is voor onze vergelijking van de PTSS-vatbare en resistente dieren en veel 'ruis' veroorzaakt. Vorig onderzoek heeft aangetoond dat de trigger absoluut noodzakelijk is voor de ontwikkeling van PTSS-achtige symptomen in de dieren (Lebow et al. 2012); wanneer ze niet 'getriggerd' worden, herstellen de dieren prima. Men merkt dit ook gedragsmatig aan de muizen; na de trigger gedragen ze zich veel gestresster dan na het trauma, terwijl ze bij deze

laatste aan meer en intensievere elektrische schokken zijn blootgesteld. Dit zou enerzijds kunnen betekenen dat er een cruciaal proces plaatsvindt tijdens de trigger wat specifiek is voor PTSS-achtige dieren. Een dergelijk proces kan het best geadresseerd kan worden door selectief te kijken naar de neurale respons op de trigger. Anderzijds zou het ook zo kunnen zijn dat er een proces in gang wordt gezet tijdens de blootstelling aan het trauma, dat er vervolgens voor zorgt dat de trigger de muizen over de drempel duwt. We willen daarom graag beide opties apart van elkaar onderzoeken, maar alleen in onderdeel A van het onderzoek. Gebaseerd op de bevindingen in onderdeel A zullen we ons toespitsen op 1 van de 3 methoden om de afwijkende trauma-gerelateerde activiteit/plasticiteit het best te targeten. We hebben deze toelichting nu ook opgenomen in de herziene beschrijving van de experimenten.

- DAP1 vraag A2, IV: We zien de beschreven bepaling van de neuroendocriene functie als zeer waardevolle toevoeging aan ons onderzoek. Eerder onderzoek met dit model voor PTSS (Lebow et al. 2012) heeft namelijk aangetoond dat de PTSS-vatbare dieren een onderdrukte corticosteron stress respons vertonen t.o.v. de resistente dieren; een bepaling die compleet onafhankelijk van de categorisatie van de dieren als PTSS-vatbaar of resistent (gebaseerd op gedrag) plaatsvindt, en in overeenstemming is met het neuroendocriene fenotype van patiënten die lijden aan PTSS (Yehuda 2001). Daarnaast hebben we deze bevindingen in ons eigen lab gerepliceerd. Een groot vraagstuk in het humane PTSS onderzoek is wanneer deze afwijkende neuroendocriene functie zich precies ontwikkelt; vormt deze een vatbaarheidsfactor voor PTSS, of is deze het gevolg van de ontwikkeling van de ziekte? Er is een opkomende theorie dat corticosteron noodzakelijk is voor adequaat herstel van stress (Hermans et al. 2014), en daarmee dus erg belangrijk bij de mogelijke ontwikkeling van PTSS. In dit onderzoek meten we allereerst de basale corticosteron niveaus in de ochtend en avond om het circadiane ritme te meten, aangezien hierin ook afwijkingen zijn geconstateerd in PTSS-patiënten (Daskalakis et al. 2013). Daarnaast zullen we de corticosteron reactie op het trauma en de trigger meten om te bepalen of PTSS-vatbare en resistente dieren in hun reactie verschillen, zoals gesuggereerd wordt in sommige humaan onderzoek (McFarlane 2000; Witteveen et al. 2010). Mocht dit zo zijn dan zou toediening van hydrocortison na trauma blootstelling een mogelijke interventie methode zijn voor PTSS (Schelling et al. 1999, 2001, 2002; Zohar et al. 2011). Als laatste meten we dus de reactie op een gestandaardiseerde stressor in het lab, waarbij al eerder verschillen tussen de vatbare en resistente dieren zijn gerapporteerd. Door deze metingen te verrichten in dezelfde dieren als waarin we de hersenactiviteit/plasticiteit bepalen, kunnen we vervolgens correlatieve analyses verrichten naar de relatie tussen deze bepalingen, om zo een beter idee te krijgen van de onderliggende neurale mechanismen aan deze neuroendocriene afwijkingen.

- DAP1 vraag A2. De immunohistochemische en in situ-hybridisatie experimenten zijn aan de beschrijving toegevoegd. Het is echter niet ons primaire doel met deze experimenten de activatie of plasticiteit van de gelabelde cellen te bevestigen. We willen middels deze experimenten extra informatie verkrijgen over het type cel dat gelabeld is (excitatoir vs inhibitor) en de (stress-gerelateerde) eiwitten die deze cellen tot expressie brengen. Zoals eerder aangegeven is Q-PCR helaas niet mogelijk met dit weefsel.

- DAP1 vraag A3: Voor onderzoeksvraag 2 (het bepalen van abnormale activiteit/plasticiteit van hersencellen tijdens de blootstelling aan het trauma en de trigger) is het belangrijk te weten welke hersenactiviteit/plasticiteit direct gerelateerd is aan de traumatische ervaring

en niet aan overige omstandigheden, zoals de injectie van 4-OHT of de blootstelling aan een nieuwe omgeving. In tegenstelling tot tamoxifen (dat een delay kent in de labeling van enkele uren) labelt 4-OHT namelijk vrijwel direct alle actieve/plastische cellen, en veroorzaakt daarmee mogelijk een soort achtergrondruis. De controle dieren zijn in deze experimenten nodig ter vergelijking met de getraumatiseerde groepen, om zo de neuronale respons op het PTSS-inductie protocol te kunnen identificeren. Daarnaast biedt de vergelijking van de controle groep met de resistente muizen informatie over een adaptieve respons op trauma's, wat ook erg waardevolle informatie is.

- DAP1 vraag D2: We danken de commissie voor deze kritische noot en zullen de dieren dagelijks checken voor een goede bepaling van humane eindpunten. We hebben dit gewijzigd in het projectvoorstel. Daarnaast hebben we de vermelding van groepshuisvesting verwijderd in dit onderdeel.

- DAP1 vraag J: We hebben deze wijzigingen doorgevoerd.

- DAP1 vraag K: Het cumulatieve ongerief voor de dieren is matig of ernstig (afhankelijk van de groep waartoe het dier behoort). We hebben deze informatie toegevoegd aan de herziene beschrijving van de dierprocedures.

NB. We hebben de benodigde aanpassingen voor de dierprocedures van onderdeel A ook doorgevoerd in de onderdelen B en C, zoals de commissie suggereerde.

Referenties

- Daskalakis NP, Lehrner A, Yehuda R (2013) Endocrine aspects of post-traumatic stress disorder and implications for diagnosis and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 42(3):503-13.
- Hermans EJ, Henckens MJ, Joëls M, Fernández G (2014) Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. *Trends Neurosci* 37(6):304-14.
- Kessler RC, Sonnega A, Bromet E, Hughes M, Nelson CB (1995) Posttraumatic Stress Disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 52(12):1048-60.
- Lustyk MK, Douglas HA, Shilling EA, Woods NF (2012) Hemodynamic and psychological responses to laboratory stressors in women: assessing the roles of menstrual cycle phase, premenstrual symptomatology, and sleep characteristics. *Int J Psychophysiol* 86(3):283-90.
- Maguen S, Luxton DD, Skopp NA, Madden E (2012) Gender differences in traumatic experiences and mental health in active duty soldiers redeployed from Iraq and Afghanistan. *J Psychiatr Res* 46(3):311-6.
- McFarlane AC (2000) Posttraumatic stress disorder: a model of the longitudinal course and the role of risk factors. *J Clin Psychiatry* 61 Suppl 5:15-20; discussion 21-3.
- Olf M, Langeland W, Draijer N, Gersons BP (2007) Gender differences in posttraumatic stress disorder. *Psychol Bull* 133(2):183-204.
- Ossewaarde L, Hermans EJ, van Wingen GA, Kooijman SC, Johansson IM, Bäckström T, Fernández G (2010) Neural mechanisms underlying changes in stress-sensitivity across the menstrual cycle. *Psychoneuroendocrinology* 35(1):47-55.
- Santiago PN, Ursano RJ, Gray CL, Pynoos RS, Spiegel D, Lewis-Fernandez R, Friedman MJ, Fullerton CS (2013) A systematic review of PTSD prevalence and trajectories in DSM-5 defined trauma exposed populations: intentional and non-intentional traumatic events. *PLoS One* 8(4):e59236.
- Schelling G, Stoll C, Kapfhammer HP, Rothenhäusler HB, Krauseneck T, Durst K, Haller M, Briegel J (1999) The effect of stress doses of hydrocortisone during septic shock on posttraumatic stress disorder and health-related quality of life in survivors. *Crit Care Med* 27(12):2678-83.
- Schelling G, Briegel J, Roozendaal B, Stoll C, Rothenhäusler HB, Kapfhammer HP (2001) The effect of stress doses of hydrocortisone during septic shock on posttraumatic stress disorder in survivors. *Biol Psychiatry* 50(12):978-85.
- Schelling G (2002) Effects of stress hormones on traumatic memory formation and the development of posttraumatic stress disorder in critically ill patients. *Neurobiol Learn Mem* 78(3):596-609.
- Witteveen AB, Huizink AC, Slottje P, Bramsen I, Smid T, van der Ploeg HM (2010) Associations of cortisol with posttraumatic stress symptoms and negative life events: a study of police officers and firefighters. *Psychoneuroendocrinology* 35(7):1113-8.

Yehuda R (2001) Biology of posttraumatic stress disorder. J Clin Psychiatry 62 Suppl 17:41-6.

Zohar J, Yahalom H, Kozlovsky N, Cwikel-Hamzany S, Matar MA, Kaplan Z, Yehuda R, Cohen H (2011) High dose hydrocortisone immediately after trauma may alter the trajectory of PTSD: interplay between clinical and animal studies. Eur Neuropsychopharmacol 21(11):796-809.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum: 09-11-2015

- Strekking van de vragen:

Niet-technische samenvatting:

-De NTS bevat nog spelfouten, het taalgebruik is nog niet overal vereenvoudigd, en de formulering is soms wat moeizaam. De samenvatting is nu een stuk langer dan 500 woorden geworden.

-3.5 De percentages dieren die respectievelijk mild, matig of ernstig ongerief ondervinden zijn nog niet gegeven. Ook klopt het totale aantal dieren bij 3.5 niet met het aantal opgegeven bij 3.3. De onderzoekers geven een uitgebreide beschrijving van de oorzaken van het ongerief, maar kunnen hier volstaan met het vermelden van het cumulatieve ongerief en de percentages dieren die het respectievelijk betreft.

Project Proposal:

-3.2 De haalbaarheid van de doelstelling is nog niet onderbouwd.

Description of Animal Procedures:

-De inschatting van het ongerief als gevolg van de onvermijdbare en onvoorspelbare elektrische schokken om PTSS te induceren bij een deel van de dieren is in strijd met de richtlijn waarnaar in de Wet op de Dierproeven wordt verwezen. Volgens deze richtlijn is alleen de onvermijdbaarheid van de schokken al reden om het ongerief als ernstig te beschouwen. Bovendien is de commissie van mening dat de gehanteerde verlichting en het lawaai voor muizen niet van slechts matige intensiteit zijn. De aanname dat de dieren die geen PTSS oplopen als gevolg van de schokken, derhalve die schokken ook als minder onaangenaam hebben ervaren dan de dieren die wel PTSS hebben opgelopen, is bovendien nergens op gebaseerd. De commissie zal in haar advies voor de CCD uiteenzetten waarom zij op dit punt afwijkt van de ongeriefclassificatie door de onderzoekers, tenzij de onderzoekers alsnog deze ongeriefclassificatie aanpassen.

-DAP1, vraag A2. De functie van corticosteron als herstelhormoon na stress is wetenschappelijk aangetoond. De onderzoekers worden verzocht hiervoor een relevante internationale referentie toe te voegen en niet alleen naar PTSS-werk te verwijzen.

-De commissie geeft u ter overweging om meteen al extra muizen aan te vragen om Q-PCR te kunnen doen. Een veel gehanteerde volgorde is om eerst met Q-PCR te onderzoeken of het gen kwantitatief reageert, en daarna pas in situ hybridisatie en immunohistochemie toe te passen.

- Datum antwoord: 11-11-2015

- Strekking van de antwoorden:

Niet-technische samenvatting:

- We hebben de NTS verbeterd en ingekort.

- 3.5: We hebben bij punt 3.5 de percentages dieren die matig/ernstig ongerief ondervinden toegevoegd. Ook komen nu de aantallen dieren opgegeven bij punten 3.5 en 3.3 met elkaar overeen.

Project Proposal:

- 3.2: We hebben deze onderbouwing nu toegevoegd. Er staat nu: "[REDACTED]

[REDACTED] supporting its relevance, innovative nature, and feasibility. We have the experience and facilities in-house to perform the required studies. Researchers involved in this proposal have extensive experience with the proposed PTSS model, as well as the use of the proposed techniques (qPCR, immunohistochemistry, neuronal tracing, and optogenetics) for the experiments. Moreover, in collaboration with others, the researchers have already performed (successful) preliminary tests in the proposed transgenic mouse lines. The use of an available light-sheet microscope will further facilitate the analyses of fluorescent labeling."

Description of Animal Procedures:

- We hebben de ongeriefclassificatie van alle dieren die blootgesteld worden aan de onvermijdbare elektrische schokken op aanraden van de DEC aangepast naar ernstig.

- DAP1, vraag A2: Het idee dat corticosteron als herstelhormoon na stress functioneert (ook in het brein) vindt inderdaad een steeds breder draagvlak in de internationale wetenschappelijke gemeenschap. We hebben daarom in overeenstemming met dit commentaar enkele referenties naar ander relevant wetenschappelijk onderzoek toegevoegd.

- We danken de commissie voor deze suggestie en zijn het met haar eens dat qPCR experimenten ons extra inzicht zullen verschaffen in de mechanismen die aan de veranderde activiteit/plasticiteit van de geïdentificeerde cellen ten grondslag liggen. Daarnaast zullen ze ons ook extra informatie opleveren over de aard van de cellen. We hebben deze experimenten nu toegevoegd in de herziene projectaanvraag bij onderdeel A. We beschrijven nu dat we na de identificatie van de relevante hersengebieden (in de eerste groep dieren beschreven in onderdeel A) in een nieuwe groep dieren eerst een qPCR zullen verrichten op de geïdentificeerde fluorescente cellen (door ze eerst te isoleren d.m.v. 'Fluorescence-Activated Cell Sorting' (FACS)) om een idee te krijgen welke (activiteit/plasticiteit- en stress-gerelateerde) genen ten grondslag liggen aan de veranderde activiteit/plasticiteit. Vervolgens zullen we door middel van in situ hybridisatie en immunohistochemie (in het hersenweefsel verkregen van de eerste groep dieren) bevestigen dat deze genen tot expressie worden gebracht in de fluorescent gekleurde cellen.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to elucidate aberrant neuronal circuit function differentiating the PTSD-vulnerable from [REDACTED] mice to enhance the understanding of PTSD etiology.' De te behalen onderzoeksresultaten zullen duidelijk maken of er verschillen zijn te identificeren in het functioneren van hersencircuits tussen muizen die wel of niet PTSS ontwikkelen na blootstelling aan een combinatie van een traumatische gebeurtenis en een daaropvolgende trigger. Er wordt onderzocht of er verschillen zijn te identificeren voorafgaand, tijdens, of na de PTSS-inductie. Deze resultaten zullen leiden tot een beter begrip van de ziekte, en kunnen op termijn leiden tot betere preventie en behandeling van PTSS. Deze aandoening kent een hoge prevalentie in de bevolking, en heeft een grote impact op de kwaliteit van leven van patiënten en hun naasten. Maatschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat de resultaten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van effectievere therapieën voor, en mogelijk ook preventie van, PTSS, wat zou resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak 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, zoals ook tot uiting is gekomen in [REDACTED]. De gekozen aanpak leidt tot betrouwbare uitspraken over de verschillen in het functioneren van hersencircuits tussen muizen die gevoelig dan wel resistent zijn voor het ontwikkelen van PTSS, en geeft meer inzicht in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn.
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 bepaald door de inductie van PTSS. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde gedragstesten, de bloedafnames en de i.p. injectie in als licht. Het ongerief als gevolg van de stress door de bewegingsbeperking schat de DEC in als matig. De commissie is van mening dat alle dieren die worden blootgesteld aan de onverwachte en onvermijdbare elektrische schokken ernstig ongerief ondergaan, ongeacht het feit of zij later PTSS zullen ontwikkelen of niet. De DEC is van mening dat de combinatie van al deze factoren tot ernstig ongerief leidt. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is dus juist ingeschat als ernstig voor alle dieren. Indien voor de uitvoering van een deel van de proeven PTSS-inductie niet nodig blijkt, zal het ongerief voor 4% van de dieren matig in plaats van ernstig zijn.
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. Een aandoening die ontstaat door de verwerking

in de hersenen van een traumatische gebeurtenis en die effecten op het gedrag heeft kan niet goed bestudeerd worden zonder proefdiermodellen.

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 beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren. Door het toepassen van meerdere go/no go momenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1992 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. Dagelijkse controles van de dieren zorgen ervoor dat bij onverwacht optredend ongerief tijdig kan worden ingegrepen. Waar mogelijk worden transgene dieren gebruikt waardoor PTSS-inductie niet nodig is en het ongerief voor de dieren beperkt wordt tot matig. 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 etiologie van PTSS bij muizen, en in de moleculaire mechanismen die hierbij betrokken zijn. De resultaten zullen duidelijk maken of er verschillen zijn te identificeren in het functioneren van hersencircuits tussen muizen die wel PTSS ontwikkelen en muizen die geen PTSS ontwikkelen na blootstelling aan een combinatie van een traumatische gebeurtenis en een daaropvolgende trigger. Het is aannemelijk dat deze inzichten op termijn zullen bijdragen aan effectievere therapie en mogelijk ook preventie van PTSS bij mensen. Het belang van meer inzicht in de etiologie van PTSS en de ontwikkeling van nieuwe interventies acht de DEC substantieel, gezien de hoge prevalentie van PTSS in de bevolking en de impact daarvan op de kwaliteit van leven.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat (vrijwel) alle dieren ernstig ongerief zullen ondervinden als gevolg van de PTSS-inductie in combinatie met de daarvoor benodigde handelingen. De commissie is zich er van bewust dat het gebruikte model zeer belastend is voor de dieren. Dit vergt een sterke rechtvaardiging in de vorm van een doelstelling die haalbaar geacht mag worden en die minimaal van substantieel belang is. Verder dient duidelijk te zijn dat alle mogelijkheden voor vervanging, vermindering en/of verfijning ook daadwerkelijk toegepast zullen worden. De commissie is er van overtuigd dat dit het geval is. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstelling kunnen realiseren. Het realiseren van die doelstelling, meer inzicht in de etiologie van PTSS, kan een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van nieuwe interventies voor de behandeling en preventie van PTSS.

De DEC is daarom 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen Instantie
voor Dierenwelzijn

Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN (628)



**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
AVD103002015327

Bijlagen

2

Datum 26 november 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015327. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

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: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens 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]

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]
Naam: [REDACTED]
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN (628)

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 december 2015
Geplande einddatum: 25 december 2020
Titel project: Neural correlates of post-traumatic stress disorder: natural resilience as key for interven
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de hersenkenmerken die beschermen tegen post-traumatische stress st
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ()
E-mailadres DEC:

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: Nijmegen
Datum: 25 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen
Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen Instantie
voor Dierenwelzijn

[Redacted]
Postbus 9101, [Redacted]
6500 HB NIJMEGEN
[Barcode] [Redacted]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD103002015327
Bijlagen
2

Datum 26 november 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 26 november 2015
Vervaldatum: 26 december 2015
Factuurnummer: 15700327
Ordernummer: 040823-461220/2015-090/[Redacted]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015327	€ 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
Instantie voor Dierenwelzijn

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN (628)



**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
AVD103002015327
Bijlagen
1

Datum **11 JAN 2016**
Betreft **Beslissing Aanvraag projectvergunning Dierproeven**

Geachte [REDACTED]

Op 25 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neural correlates of post-traumatic stress disorder: natural resilience as key for intervention" met aanvraagnummer AVD103002015327. 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 "Neural correlates of post-traumatic stress disorder: natural resilience as key for intervention" starten. De vergunning wordt afgegeven van 11 januari 2016 tot en met 25 december 2020. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

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

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 november 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. In aanvulling daarvan is een algemene voorwaarde vanuit artikel 10, lid 1a van de wet opgenomen.

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:

- 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 9101, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 11 januari 2016 tot en met 25 december 2020, voor het project "Neural correlates of post-traumatic stress disorder: natural resilience as key for intervention" met aanvraagnummer AVD103002015327, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 25 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 november 2015;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 november 2015, ontvangen op 25 november 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
A. Identification of PTSD-associated neuronal activation and plasticity	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / cFos- CreERT2 and Arc-CreERT2; volwassenen	1104	Ernstig / severe	Cumulatief ernstig ongerief.
B. Characterization of PTSD-associated neuronal circuits	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / cFos- CreERT2 and Arc-CreERT2; volwassenen	312	Ernstig / severe	Indien er voor Approach II wordt gekozen zullen maximaal 72 dieren worden gebruikt, en het ongerief zal cumulatief matig zijn, in plaats van cumulatief ernstig voor Approach I.
C. Manipulation of PTSD-associated neuronal circuits	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / cFos-CreERT2 en Arc-CreERT2; volwassenen	576	Ernstig / severe	Cumulatief ernstig ongerief.

Voorwaarden

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

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

Voorschriften

In verband met het ernstige ongerief wordt er een beoordeling achteraf bij dit project vereist. Deze moet binnen een jaar na de afloop van de vergunning plaatsvinden, uiterlijk 24 december 2020.

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 december 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.

Inventaris Wob-verzoek W16-09S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2015328								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x	x		x	
5	DEC-advies				x	x	x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Niet-technische samenvatting herzien	x							
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x	x	



23 NOV. 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 [redacted]

Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie [redacted]

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [redacted]

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.

KvK-nummer [redacted]

Straat en huisnummer [redacted]

Postbus [redacted]

Postcode en plaats [redacted]

IBAN [redacted]

Tenaamstelling van het rekeningnummer [redacted]

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters [redacted] Dhr. Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

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

(Titel) Naam en voorletters [redacted] Dhr. Mw.

Functie [redacted]

Afdeling [redacted]

Telefoonnummer [redacted]

E-mailadres [redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input checked="" 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 | 0 1 . 0 4 . 2 0 1 6 |
| Einddatum | 3 1 . 0 3 . 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Stability of a mucosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin
- 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 | Postbus 196; 9700 AD Groningen |
| 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.
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-RUG advies


6 Ondertekening

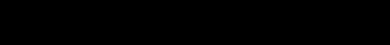
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

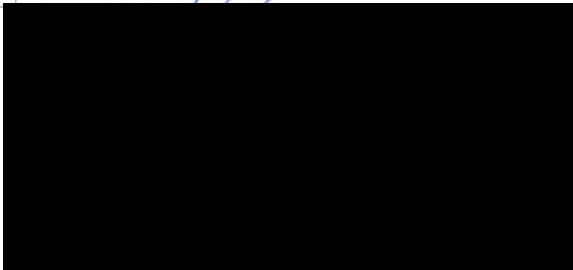
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 23 - 11 - 2015

Handtekening 



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.
-

Vaccines are one of the most cost-effective medical interventions. Despite this fact, there are still many infectious disease indications for which an effective vaccine is lacking, only suboptimal protection is provided by the existing vaccines or existing vaccines provide insufficient protection in specific target groups. Therefore, the need for new or improved prophylactic vaccines to prevent infectious diseases urges further vaccine development.

Traditionally prophylactic vaccines against infectious diseases have been based on attenuated or inactivated forms of the pathogen. In order to reduce safety issues related to these type of vaccines, modern vaccine development focusses often on development of subunit vaccines. These type of vaccines often require a suitable adjuvant in order to raise the immunogenicity and efficacy of the vaccine.

Another aspect is that needle-free administration of vaccines may have advantages compared to the traditional intramuscular vaccines. It may be easier to implement new needle-free vaccines (e.g. nasally or orally administered) in the existing childhood vaccination programs, in which children sometimes already get two injected vaccines per consult. Also, vaccine acceptance may increase because of lower risks or stress. Moreover, mucosally administered vaccines may raise local immunity at the mucosae (which is not elicited by intramuscular vaccines) that can contribute to enhanced vaccine efficacy.

For the above mentioned challenges it is critical to develop effective subunit antigens that are combined with powerful, but safe adjuvants to make more effective and well-tolerated vaccines.

██████ developed a mucosal adjuvant that is based on particles of non-living bacteria. The particles are based on safe non-pathogenic Gram-positive bacteria such as the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis*. The particles, called bacterium-like particles (BLPs), are based on bacteria that do not contain endotoxins such as LPS and do not contain recombinant DNA. The non-living particles do not produce the vaccine antigen. The vaccine subunit antigen is obtained from another source (recombinantly produced or commercially acquired) and is combined with the BLP either in a mixing format in which there is no binding of the antigen to the BLP or in a bound format in which the antigen is attached to the BLP surface. The attachment of the antigen to the BLP surface is achieved by engineering a specific proteinaceous domain into the subunit antigen. This proteinaceous domain (an amino acid sequence originating from a Lactococcal protein) has high affinity for the surface of the BLP. In this way, antigens are bound in a non-chemical way to the BLPs. Binding is very stable and in this format the BLPs act as a carrier with intrinsic immunostimulatory properties.

The mode of action of BLPs in mice has been investigated (Keijzer et al. 2014. *Vaccine* 32:2904–2910) and it was shown that immune responses depend on the presence of Toll-like receptor 2 on cells of the innate immune system. Stimulation of the immune system through the innate immune system is required to obtain durable, long-lived responses through the adaptive immune system. It has also been shown that BLPs elicit balanced Th1/Th2-type responses (Saluja et al. 2010. *AAPS J.* 12:109-116), which reduces safety concerns associated with excessively Th2- or Th1-skewed immune responses.

██████ has used the BLP technology extensively, also in external collaborations for research on vaccines directed against Influenza virus, Hepatitis B virus, RSV, malaria, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *Shigella* ssp and *Yersinia* ssp mostly in mouse models, but in a number of cases also in Wistar rat, cotton rat, ferret and rabbit models. In all cases, efficacy was shown without local and systemic side effects (Van Braeckel-Budimir et al. 2013. *Front. Immunol.* 4:282).

As part of a previous DEC-RUG basic project (in that DEC project the BLPs were described as Gram-positive enhancer matrix [GEM]) [REDACTED] conducted several vaccine experiments at the UMCG facilities, these included different subunit vaccine antigen formulations with and without adjuvant administered nasally or intramuscularly. The experiments were all in mouse models and focused on determining the immunological responses, locally and systemically, humoral and cellular. The experiments included identification of (i) immunologically relevant subunit antigens, (ii) the optimal vaccine formulation, (iii) the optimal route of administration, (iv) dose finding. Furthermore, the immunization experiments were used to determine/characterize (i) the mode of action of BLPs, (ii) the type of immune responses, (iii) the durability of responses, and were exploited to develop and use models to determine the potency of BLP batches and of RSV vaccine batches.

BLPs are produced by [REDACTED] on an R&D scale and by contract manufacturing organizations (CMOs) under Good Manufacturing Procedures (GMP) conditions for the production of clinical batches. A GMP BLP batch has been used as part of an intranasal Influenza vaccine formulation that was tested in a human Phase I trial in 2010-2011. The vaccine was well tolerated in humans (no reactogenicity and/or tolerability issues compared to placebo) and induced both local and systemic Influenza-specific immune responses (Van Braeckel-Budimir et al. 2013. Front. Immunol. 4:282).

The production of different BLP batches requires monitoring of the quality of the material which includes currently an in vivo potency test (intranasal immunizations of mice). In vivo potency tests are often required in early stages of vaccine development. During the past years [REDACTED] has been working on a cell-based assay as replacement for the BLP in vivo potency test, however, a reliable correlation between potency in the cell-based assay and the in vivo potency assay could not be determined yet. Hence, the in vivo potency test for BLPs still remains necessary for a reliable determination of the potency of BLP batches.

Despite the fact that [REDACTED] developed [REDACTED]

In addition, for the GMP grade clinical trial material it is a regulatory requirement to monitor the stability of the material at least during the clinical trials. The stability tests include monitoring the in vivo potency over time. Currently, [REDACTED] has two clinical BLP batches in a formal stability study, already running for almost 1 year. As part of these studies, BLP in vivo potencies assays have been performed at T=0 and 6 months (under an approved DEC that is now expiring). In order to complete these stability studies, BLP mouse potency studies are required at T=12, 18, 24, 36 and 48 months. At these timepoints we will include R&D batches obtained through modified production processes that aim to improve the production process.

In addition to the above described BLP stability program, [REDACTED] works on the development of the BLP-based intranasal RSV vaccine SynGEM. RSV (the human respiratory syncytial virus) is a major cause of seasonal epidemics of severe lower respiratory tract disease. Worldwide, an estimated 64 million RSV infections occur annually, resulting in the death of approximately 250,000 individuals (Status of RSV Vaccine R&D, WHO 2014). In the 7 major pharmaceutical markets the total annual number of hospitalizations due to RSV infections is estimated to be 900,000. While RSV attacks all age groups, the most severe disease occurs in (i) the elderly, (ii) patients with chronic lung disease, (iii) persons with impaired immunity, and (iv) very young infants (under 2 years of age). Indeed, RSV is the most important cause of viral lower respiratory tract illness (LRI) in infants and children worldwide. The current treatment is limited to application of supplemental oxygen and mechanical ventilation. The availability of pharmacotherapy is limited and the only prophylacted treatment with the neutralizing mAb Palivizumab is very costly (+/- 6,000 Euro per treatment) and therefore limited to the use in premature infants in certain high income countries. Despite the clear medical need, no licensed prophylactic vaccine is available to date. [REDACTED] developed [REDACTED]

[REDACTED] At present, this existing vaccine program is lined up to enter the clinic in 2016. Also for the SynGEM program stability studies are planned for the clinical batches. These stability studies include the monitoring of the in vivo potency using a mouse model. This SynGEM mouse potency model was set up in house under an approved DEC which is currently expiring. Therefore, this application includes the stability testing using the SynGEM mouse potency model at T=0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 months. [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 project's objective is monitoring the stability of batches of BLPs and the intranasal RSV vaccine SynGEM by determining the in vivo potency in mice models. The research questions that need to be answered are:

- what is the in vivo potency of a given BLP batch and does it remain its potency over time?
- what is the in vivo potency of a given SynGEM batch and does it remain its potency over time?

The BLP and SynGEM mouse potency assays are both existing models that were developed under an existing DEC. Both models were set up to discriminate between 'good' and 'bad' batches. For both models a reference batch (100% potency) has been laid down that is used as 'good' batch throughout the entire study. ████████ developed both models. Moreover, ████████ personnel are highly trained and knowledgeable for these type of vaccination experiments with respect to animal handling, vaccine administration, sampling and termination.

3.3 Relevance

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

The objectives described above fit in the overall aim of ████████ to develop a reliable and safe BLP adjuvant for the development of new types of subunit vaccines to prevent infectious diseases in general and the intranasal RSV vaccine SynGEM in particular. The BLP adjuvant may enable the development of vaccines that are administered through a non-invasive route (e.g. nasal spray or oral capsules), which may enhance compliance and therefore may have a positive effect on the participation of individuals in vaccination programs. A new RSV vaccine will help to reduce the disease burden in young children and elderly. Overall, the development of BLP-based mucosal subunit vaccines and the intranasal SynGEM in particular target to develop products that will minimize doctor visits, hospitalizations and medications, hence it will reduce overall healthcare costs.

3.4 Research strategy

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

The research strategy for the existing intranasal RSV vaccine (SynGEM) and BLP stability program is limited to testing and monitoring vaccine potency using the existing in vivo mice potency models. Each stability program of the SynGEM and BLP experimental products that are tested in the clinic, includes storage of the products at two temperatures (T1 and T2). T1 ('desired temperature') is the storage temperature for which (limited) stability data is available, but which gives at present most certainty the product will be stable for a reasonable time. T2 is a higher storage temperature ('elevated temperature') which enables to obtain a better understanding of the product stability in a shorter time.

In the mouse potency models, clinical BLP and SynGEM batches are compared with a reference batch ('good batch') to monitor the potency level of the test batches in time. The reference BLP or SynGEM batch is the same in each experiment (the reference batches are stored at -80 degrees Celsius). In each experiment, the subunit antigen is given intramuscularly without adjuvant to check the immunogenicity of the antigen (positive control). A maximum of two additional R&D BLP or SynGEM batches will be combined with each timepoint experiment in order to reduce the number of experiments and thereby reducing the number of animals needed (saves on the number of reference and positive control groups). The reference and test groups will be given the

vaccine by the intranasal route. The potency will be determined by measuring the level of antigen-specific total serum IgG levels and compare the means of the test groups with the mean of the reference group.

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 basic outline of the in vivo BLP potency mouse test:

- BLP batches to be tested and the reference batch are mixed in a standard ratio with hemagglutination (HA) antigen of influenza (used as the standard antigen and the same in all time points). The reason that the mixed mode is used is for historic reasons. The BLP potency assay was developed as part of the development of an intranasal Influenza vaccine in which the BLPs were mixed with HA. This intranasal BLP-based Influenza vaccine has also been used in a clinical Phase I trial;

- Mice are intranasally vaccinated three times with the BLP test batches and reference batch. A group that receives HA antigen without adjuvant intramuscularly is taken along as positive control;

- After full vaccination terminal sera is collected to determine antigen-specific serum antibody levels.

Since 2 clinical BLP batches are currently in a stability program in which each batch is stored at two different temperatures (T1 = the desired temperature, T2 = an elevated temperature), each timepoint will comprise of 4 clinical test batches, the reference batch and a positive control for the antigen. The running BLP stability program has the following timepoints for which a determination of the in vivo potency is included: T=12, 18, 24, 36 and 48 months (T=0 and T=6 have already been conducted). A maximum of 2 R&D BLP batches will be taken along to measure the potency of new R&D batches.

The basic outline of the in vivo SynGEM potency mouse test:

- The SynGEM batches to be tested and the reference batch contain a similar level of bound RSV F subunit antigen. The reason the antigen is bound to the BLP in this potency assay is because this is the format that will be used in the intended SynGEM clinical trials;

- Mice are intranasally vaccinated two times with the SynGEM test batches and reference batch. A group that receives F antigen without adjuvant intramuscularly is taken along as positive control;

- After full vaccination terminal sera is collected to determine antigen-specific serum antibody levels.

Since 2 clinical SynGEM batches are currently being produced and will be included in a stability program in which each batch is stored at two different temperatures (T1 = the desired temperature, T2 = an elevated temperature), each timepoint will comprise of 4 clinical test batches, the reference batch and a positive control for the antigen. The SynGEM stability program has the following timepoints for which a determination of the in vivo potency is included: T=0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 months. A maximum of 2 R&D SynGEM batches will be taken along to measure the potency of new R&D batches.

The stability study for a SynGEM batch that drops in potency below the level of 30% compared to the reference batch will be terminated. An R&D SynGEM batch that has a potency lower than 30% compared to the reference batch is considered to be unsuitable for further preclinical testing.

The animal procedures that will be used in all the above described experiments will be intranasal administration of vaccines in mice as described in Appendix 1.

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.

[REDACTED]. The testing of the R&D BLP batches drives the further development of the BLP production process.

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	Vaccination test procedure
2	
3	
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 | Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | vaccinatie, slijmvliezen, adjuvans, RSV vaccin

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) | De doelstelling van het project is om de sterkte van een mucosaal adjuvans (een adjuvans dat via de slijmvliezen z'n werking heeft) en van een intranasaal respiratoir syncytial virus (RSV) vaccin in de tijd te monitoren. Beiden maken onderdeel uit van, enerzijds de ontwikkeling van een mucosaal adjuvans dat gebruikt kan worden voor het ontwikkelen van vaccins tegen infectieziekten en anderzijds de ontwikkeling van een speciek RSV vaccin dat gebaseerd is op dit mucosale adjuvans en dat via de neus toegediend wordt. Het mucosale adjuvans is gebaseerd op onderdelen van veilige melkzuurbacterien (bacterien die doorgaans gebruikt worden bij het maken van kaas). De vaccins gemaakt op basis van dit mucosale adjuvans bevatten geen recombinant DNA. Om de sterkte van de immuun respons die opgewekt kan worden met het mucosale adjuvans te meten wordt het adjuvans gecombineerd met een eiwit, en na intranasale vaccinatie worden de antistoffen in het bloed tegen dit eiwit bepaald. Om de stabiliteit van dit adjuvans te bepalen wordt deze proef in de loop van de opslag periode herhaald. In het kandidaat RSV vaccine is het mucosale adjuvans gecombineerd met 1 eiwit van het RSV virus. Het vaccin zelf bevat dus geen ziekteverwekker en is dus zeer veilig. Omdat het kandidaat RSV vaccin geproduceerd is om in een klinisch traject in de mens gestest te gaan worden, moet de stabiliteit van het vaccin in dieren bepaald worden om te kunnen garanderen dat het kandidaat RSV vaccin gedurende de looptijd van de klinische fasen (meerjarig project) dezelfde sterkte behoud. Een RSV vaccin is van belang omdat er op dit moment nog geen vaccin beschikbaar is tegen ziekte veroorzaakt door RSV. Wereldwijd is de omvang van ziekte veroorzaakt door RSV vergelijkbaar met dat voor Influenza, en met name in jonge kinderen en ouderen kan RSV ziekte zeer ernstig en levensbedreigend zijn. De ontwikkeling van een RSV vaccin wordt dan ook door de WHO als een prioriteit aangemerkt. |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | De verwachting is dat dit project bijdraagt aan de ontwikkeling van nieuwe vaccins tegen infectieziekten die op een patient vriendelijke manier toegediend kunnen worden, nl. via de slijmvliezen zoals in de neus. De stabiliteit van het mucosale adjuvans is van belang voor de toekomstige ontwikkeling van nieuwe vaccins. De stabiliteit van het intranasale RSV vaccin is van belang voor de huidige klinische ontwikkeling van dit kandidaat vaccin. Het project draagt op die manier bij aan de ontwikkeling van een vaccin tegen een ziekte waar nu nog geen vaccin voor op de markt is. Het is de verwachting dat het intranasale RSV vaccin zal bijdragen aan een betere gezondheidszorg omdat bepaalde ziekten, zoals RSV die dodelijk kunnen zijn in jonge kinderen en ouderen of die gepaard gaan met of leiden tot ernstige ademhalings problemen, bronchitis, oorontstekingen en asthma voorkomen kunnen worden. De verwachting is ook dat de ontwikkeling van het mucosale adjuvans zal leiden tot nieuwe types vaccins die toegediend kunnen worden via de neus of mond en dat dit zal leiden tot minder weerstand tegen vaccinatie. |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Alle experimenten in dit project zullen uitgevoerd worden met muizen. Over een periode van 5 jaar zullen ongeveer 1300 muizen nodig zijn. |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | De immunizaties worden uitgevoerd terwijl de dieren licht verdoofd zijn d.m.v een inhalatie verdoving. Dit wordt gedaan om de stress bij de dieren tijdens de toediening van vaccins, bloedafname en het wegen van dieren te voorkomen. De dieren ervaren geen pijn voor, tijdens of na de handelingen. Het in slaap brengen van de dieren en het ontwaken kan enige lichte stress veroorzaken. Aan het eind van de proef worden de dieren onder verdoving op een humane manier gedood. |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het | De dierproeven worden op basis van verwachte ernst ingedeeld als mild. |

project ingedeeld naar de verwachte ernst?

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden aan het eind van de proef gedood.

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.

Het opwekken van een immuunrespons is een complex samenspel van organen en cellen die zich op verschillen plekken in het lichaam bevinden, en is niet na te bootsen in simpele op cellen gebaseerde experimenten. Dergelijke op cellen gebaseerde experimenten worden wel gebruikt om bepaalde reacties op vaccins te meten, maar testen in een diersysteem is nog nodig om het eindresultaat van al die effecten op de immuunrespons te kunnen meten.

4.2 **Vermindering**

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

Voor alle typen van experimenten die we uitvoeren plegen we overleg met een biostatistiek deskundige om het minimum aantal dieren te bepalen die nodig zijn om significantie van de resultaten aan te tonen. Verder proberen we daar waar mogelijk verschillende typen experimenten te combineren, dus verschillende vraagstellingen binnen 1 experiment te beantwoorden, om het aantal experimentele groepen te minimaliseren.

4.3 **Verfijning**

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

Voor de karakterisatie van de immuunrespons zijn voor muizen de meeste reagentia beschikbaar. Dus om de projectdoelstellingen te kunnen halen zijn muizen de beste keuze.

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

De dieren worden gehuisvest in kleine groepen (max 8) in doorzichtige bakken met voldoende voedsel, water, bodembedekking, nest en speel materiaal, in een geconditioneerde ruimte met dag- en nacht ritme. Overdag is in de huisvestingruimte (zachte) muziek te horen zodat schrik-effecten bij de dieren geminimaliseerd worden wanneer mensen de ruimte betreden. De toegepaste inhalatie verdoving veroorzaakt bij de dieren enige desorientatie bij het in slaap brengen en bij het ontwaken. De hoeveelheid verdoving is zodanig afgesteld dat deze heel licht is, wanneer de inhalatie van het verdovingsmiddel wordt gestopt, ontwaken de dieren binnen enkele minuten. Mochten de dieren tijdens een proef onverwachts lijken te lijden, dan zullen de dieren op humane wijze worden gedood.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.zbo-ccd.nl).
- 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	Vaccination test procedure

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.

The general design of the animal procedures using female mice:

- a) blood collection prior to each vaccine administration. The maximum allowed volumes per gram body weight will be used;
- b) intranasal vaccine administration of the test batches and intramuscular administration of the antigen alone (positive control);

- c) termination of the animals;
- d) collection of final serum.

The serum samples are used to determine the levels of antigen-specific serum antibodies by ELISA. This is commonly used as a biomarker for vaccine efficacy.

This general design is being used for the BLP as well as for the intranasal RSV vaccine SynGEM potency tests. Both potency tests have been developed and have been used in the past to discriminate between 'good' and 'bad' batches.

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

For the BLP potency assay the animal procedures are:

- [REDACTED] vaccinations in the test and reference groups, and [REDACTED] vaccinations in the positive control group (separate group). [REDACTED]
- [REDACTED]

For the SynGEM potency assay the animal procedures are:

- [REDACTED] vaccinations in the test and reference groups, and [REDACTED] vaccinations in the positive control group (separate group). [REDACTED]
- [REDACTED]

For both protocols, at each vaccination time point, body weight measurements and blood withdrawal will be done. Body weight measurements will be done in any case once a week, if not combined with vaccination, without the use of anaesthesia. Vaccines will be given under general inhalation anaesthesia. Volumes for intranasal and intramuscular vaccine administration will be up to the maximum indicated in the guidelines. Blood withdrawal will be combined with vaccine administration and will be done from the submandibular vein up to the maximum volume allowed per gram body weight. Repetitive blood sampling (n+1 as described above) will enable us to follow the kinetics of immune responses. At the end of the experiment, blood will be collected via cardiac puncture under general inhalation anaesthesia and animals will be terminated via cervical dislocation.

Both protocols were developed to provide the most optimal results in terms of serological read out.

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

ANOVA-tests for trends have been used to test the hypothesis of equal means against the two-sided alternative. For the group size determination a power of 80% with an alpha of 5% and an anticipated difference of a factor 2 and an SD of a factor 4 is taken into account.

B. The animals

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

Inbred female SPF mice like BALB/c are used for these experiments. Female mice have been used to set up both potency models, therefore we are restricted to the use of female mice. Female mice are usually less aggressive which makes housing in groups easier and it also allows for monitoring the mucosal antibody response in a non-invasive manner at a distant site from nasal if needed. The BALB/c strains are commonly used in vaccine research and [REDACTED] has a lot of experience in using these animals in the BLP and SynGEM potency models. The animals will be purchased from suitable commercial vendors such as Harlan, Jackson, Charles River or equivalent. Animals of 6-8 weeks old will be purchased in order to have young adult mice with a mature immune system at the study start.

For the BLP potency assay a group [REDACTED] for the test batches and reference batch was determined to be needed in order to meet the statistical requirements. The positive control group consists [REDACTED] since these are not required for the statistical evaluation. [REDACTED]

The following numbers were used to calculate the overall number of mice needed for the BLP stability study:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

For the SynGEM potency assay a group [REDACTED] for the test batches and reference batch was determined to be needed in order to meet the statistical requirements. The positive control group consists [REDACTED] since these are not required for the statistical evaluation. [REDACTED]

The following numbers were used to calculate the overall number of mice needed for the BLP stability study:

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED]

The total number of mice needed for the BLP and SynGEM potency experiments is [REDACTED]. We request a number of mice as a reserve in case of unforeseen calamities such as a mix up of vaccine batches or contamination of vaccines or mice. For this purpose we calculated 1 repetition of a potency assay with two test groups ([REDACTED]), a reference group ([REDACTED]) and a positive control group ([REDACTED]), which totals to [REDACTED].

The overall number of mice requested therefore totals to [REDACTED]

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 working on a TLR2-specific cell-based assay to determine the potency of BLPs, but at this moment there is not yet a reliable correlation between the in vivo potency of BLPs and the in vitro potency. Nevertheless, we keep improving this assays and/or exploring additional in vitro assays to replace the BLP in vivo potency assay. Also for the intranasal SynGEM vaccine, we are trying to develop an in vitro ELISA based assay. It is our goal to prevent use of in vivo potency assays or replace them as soon as possible with in vitro potency assays. However, in early stages of vaccine development in vivo potency assay can usually not be avoided.

- Reduction: by aligning the testing of R&D BLP and SynGEM batches with the stability testing we minimize the number of experiments and the number of animals because it reduces the use of reference and positive control groups. Furthermore, statistical methods were used to determine the optimal number of animals per group to obtain significant results. In that way, unnecessary repetition of experiments can be avoided and reduces the number of animals to achieve the research goals.

- Refinement: by combining treatments, e.g. blood withdrawal, vaccine administration and bodyweight measuring during one anaesthesia session per animal, the time and frequency the animals will experience stress will be limited.

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

- 1). By combining treatments (e.g. blood withdrawal, vaccine administration, bodyweight measuring) the total time and frequency of the animal procedure is minimized. By using inhalation anaesthesia stress as a result of the handlings is avoided and pain and suffering at termination is prevented. Only qualified personnel highly experienced in the applied animal procedure will be involved in the execution of the experiments in order to minimize stress for the animals.
- 2). No adverse effects on the environment since the animals are housed in a closed facility.

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 stability of the BLPs and the SynGEM vaccine is monitored in time to guarantee that optimal material is used during the clinical trials. Multiple R&D batches of BLPs need to be tested in order to further optimize the BLP production process and multiple R&D SynGEM batches need to be tested in order to guarantee optimal performance of R&D batches in other (more costly) preclinical animal models.

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?

BLP-based vaccines have been used in various animal models. In all models the BLP mucosal adjuvant was very well tolerated without adverse effects. Blood withdrawal from the submandibular vein to the maximum allowable volume per g body weight is well tolerated without adverse effects. The animals may experience minimal discomfort during application of general inhalation anaesthesia and waking up and/or shortly after vaccine administration and/or

blood sampling.

Explain why these effects may emerge.

Minimal discomfort during vaccine application, shortly after vaccine application and blood sampling may be experienced by the animals as a result of stress in the form of stress as a result of undergoing or recovering from the general inhalation anaesthesia.

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

Procedures for vaccine administration and blood sampling will be combined as much as possible. In addition, the length of the procedures will be minimized as much as possible and the number of animals present in the experimental operations room will be minimized in order to maximally reduce exposure to stress signals from other animals. Inhalation anaesthesia is used to minimize stress and pain as a result of blood sampling or vaccine administration. Body weight will be monitored during the experimental period to identify animals with health problems.

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.

[REDACTED]. In case of a severe anaphylactic reaction to the vaccine the animals will be terminated. In addition, lethargy, immobility, ruffled fur, hunchback, tumors and severe scratching will be used as humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

BLP-based vaccines are very well tolerated by mice. [REDACTED]

[REDACTED] So far, anaphylactic reactions to the administered vaccines were never observed.

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 levels of discomfort during and shortly after vaccine administration are mild. The last step in the procedure is termination of the animals under anaesthesia.

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.

Termination of the mice is required to collect maximum volumes of final serum.

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




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

Yes

Format 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: (Interne RuG code **8035**)
2. Titel van het project: **Stability of a mucosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine.**
3. Titel van de NTS: **Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin.**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam: DEC-RUG
 - telefoonnummer contactpersoon: 

 - mailadres contactpersoon: 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **08-10-2015**
 - aanvraag compleet: **08-10-2015**
 - in vergadering besproken: **15-10-2015**
 - anderszins behandeld: **06-11-2015**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **16-10-2015 tot 05-11-2015**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **05-11-2015**
 - advies aan CCD: **18-11-2015**
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: **16-10-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:

- **Vragen t.a.v. projectaanvraag:**

- Bij 2. Categories: [redacted]

- Onder 3.4.1. [redacted]

- **Vragen t.a.v. bijlage 1:**

- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]
- [redacted]

Is dit correct?

- Datum antwoord: **05-11-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn aangebracht en verwerkt in de project beschrijving en bijlages**

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. **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**
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 **reëel**.
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 11, 13 en 13c3 van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn voornamelijk geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**, maar zoals in de aanvraag aangegeven is al veel werk verzet teneinde te komen tot een goed gevalideerde *in vitro* test.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven, zoals geïllustreerd middels de omvang van de positieve controlegroep. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij dit wettelijk vereiste 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 ondermeer gezien de toepassing van anesthesie bij vaccintoediening. 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

RSV-infectie is een virusziekte die morbiditeit en mortaliteit kan induceren bij jonge kinderen, ouderen, longpatiënten en mensen met een onvolledige afweer. Er bestaat geen specifieke therapie tegen deze infectieziekte. Het onderhavige onderzoek heeft als doel de preventie van RSV-infectie middels vaccinatie te verbeteren door gebruik van bacterium-like particles, die worden gehecht aan een subunit vaccin. De voorgestelde dierproeven dragen bij tot het bereiken van het hoofddoel van de aanvraag, namelijk te komen tot optimalisatie van het vaccin mede op basis van monitoring van de vigerende potentie van in klinisch onderzoek gebruikte batches. Het geheel vormt daarmee een toetsbare eenheid.

Per dierproef zijn de aantallen benodigde dieren inzichtelijk onderbouwd, waarbij goede aandacht is voor potentieel *in vitro* onderzoek alsmede voor duidelijk omschreven go/no go momenten [REDACTED] teneinde de vermindering en vervanging te optimaliseren. De onderzoeksgroep is bij uitstek gekwalificeerd voor het uitvoeren van dit onderzoek en beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van muizen en het daarbij beschreven ongerief. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Daarnaast is er het maatschappelijk belang: op termijn kan het project mogelijk voordelen opleveren voor de behandeling van RSV-infectie bij de mens en

daarmee hopelijk soelaas bieden voor patiënten, die vooralsnog onbehandelbaar zijn.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-RuG tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar en toetsbaar is, derhalve adviseert de DEC-RuG tot vergunningverlening.

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



**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
AVD [redacted] 2015328
Bijlagen
2

Datum 26 november 2015
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 23 november 2015.
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD [redacted] 2015328. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

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

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: [REDACTED]
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: [REDACTED]
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: [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 april 2016
Geplande einddatum: 31 maart 2021
Titel project: Stability of a muscosal adjuvant and an intranasal RSV Vaccine
Titel niet-technische samenvatting: Stabiliteit van een mucosaal adjuvans en een intranasaal RSV vaccin
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: Postbus 196, 9700 AD Groningen
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: DEC-advies

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: 
Datum: 23 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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
AVD [redacted] 2015328
Bijlagen
2

Datum 26 november 2015
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

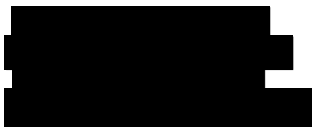
Factuurdatum: 26 november 2015
Vervaldatum: 26 december 2015
Factuurnummer: 15700328

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD [redacted] 2015328	€ 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



**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
AVD-2015328

13 JAN. 2016

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 23 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Stability of a muscosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine" met aanvraagnummer AVD-2015328. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 januari 2016 heeft u op ons verzoek een aangepaste NTS ingediend.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Stability of a muscosal adjuvant and an intranasal RSV Vaccine" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2016 tot en met 31 maart 2021.

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 18 november 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, met toevoeging van een algemene voorwaarde. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

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 de z.g.



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: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: [REDACTED]

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 april 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "Stability of a mucosal adjuvant and an intranasal RSV vaccine" met aanvraagnummer AVD [REDACTED] 2015328, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG .

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 23 november 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 november 2015;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 januari 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 november 2015, ontvangen op 25 november 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Vaccination test procedure	Muizen (Mus musculus) / inbred, vrouwen	1317	Licht / mild	

Voorwaarden

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

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.