

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202114405	openbaar	niet	geheel	deels	5.1, lid 1c	5.1, lid 2e	5.1, lid 2f	5.1, lid 2h	5.2, lid 1
1	Originele aanvraag (natte handtekening), d.d. 14-01-2021				x		x		x	
2	Aanvraag projectvergunning, d.d. 14-01-2021				x		x		x	
3	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
4	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
5	NTS bij aanvraag			x						
6	E-mail CCD aan DEC met verzoek om advies, d.d. 14-01-2021				x		x		x	
7	DEC-advies, d.d. 03-05-2021				x		x		x	
8	Aanvraag na DEC advies				x		x		x	
9	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
10	Bijlage dierproeven na DEC advies				x				x	
11	NTS na DEC advies			x	x					
12	Adviesnota aan CCD met opmerkingen, d.d. 07-05-2021				x		x		x	x
13	Adviesnota aan CCD, d.d. 07-05-2021				x		x		x	x
14	Adviesnota aan CCD, d.d. 12-05-2021				x		x		x	x
15	E-mail CCD aan vergunninghouder, d.d. 12-05-2021				x		x		x	
16	Bijlage dierproeven na vragen CCD				x				x	
17	NTS aangepast na vragen CCD en definitieve versie			x						
18	E-mail CCD aan vergunninghouder, d.d. 01-06-2021				x		x		x	
19	E-mail CCD aan lvd, d.d. 04-06-2021				x		x		x	
20	E-mail vergunninghouder i.v.m. wijzigingen, d.d. 08-06-2021				x		x		x	
21	Bijlage dierproeven aangepast na vragen CCD				x				x	
22	NTS na vragen CCD			x						
23	Adviesnota aan CCD, d.d. 17-06-2021				x		x		x	x
24	Beschikking d.d. 17-06-2022				x		x		x	
25	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectvergunning, d.d. 26-06-2021				x		x		x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

26 JAN 2021

14405

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 **5.1 lid2h**
- Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3
- Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1
- Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2
- 1.3 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- Naam instelling of organisatie **5.1 lid2h**
- Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder
- | Titel | Voorletters | Achternaam | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. | <input type="checkbox"/> Mw |
|------------------|-------------|------------|--|-----------------------------|
| 5.1 lid2e | | | | |
- E-mailadres contactpersoon **5.1 lid2e**
- Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)
- | Titel | Voorletters | Achternaam | <input type="checkbox"/> Dhr. | <input type="checkbox"/> Mw |
|-------|-------------|------------|-------------------------------|-----------------------------|
| | | | | |
- E-mailadres gemachtigde
- Vul de gegevens van het postadres in.
- Straat en huisnummer
- Postcode en plaats
- Postbus, postcode en plaats **5.1 lid2h**
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- (Titel) Naam en voorletters **5.1 lid2e** Dhr. Mw.
- Functie **5.1 lid2e**
- Afdeling **5.1 lid2h**

- 1.5 *(Indien van toepassing)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- Telefoonnummer 5.1 lid2e
- E-mailadres 5.1 lid2e
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.6 *(Indien van toepassing)* Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.
- (Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres 5.1 lid2h
- 1.7 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn
- Telefoonnummer 5.1 lid2h
- E-mailadres 5.1 lid2h
- 1.8 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 Gaat uw aanvraag over een *wijziging* op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
- 2.2 Gaat uw aanvraag over een *melding* op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?
- Nee > Ga verder met vraag 3
- Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 03 - 2021
- Einddatum (t/m) 01 - 03 - 2026
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het nabootsen van glaucoom in celweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan
- 3.4
- Naam DEC 5.1 lid2h
- Postadres

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:

Afdeling: 26 JAN 2021

Straat:

Huisnummer:

Postcode:

Plaats:

Postbus:

Postcode:

Plaats:

E-mail:

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

 Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1

 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 en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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

5.1 lid2e

Functie

5.1 lid2e

Plaats

5.1 lid2h

Datum

14 - 01 - 2021

Handtekening

5.1 lid2e

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

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 5.1 lid2h									
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen									
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3 <input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1 <input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2									
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie 5.1 lid2h									
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">Titel</th> <th style="width: 25%;">Voorletters</th> <th style="width: 25%;">Achternaam</th> <th style="width: 25%; text-align: right;"> <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw </th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="3" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw	5.1 lid2e			
Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw								
5.1 lid2e											
		E-mailadres contactpersoon 5.1 lid2e									
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 25%;">Titel</th> <th style="width: 25%;">Voorletters</th> <th style="width: 25%;">Achternaam</th> <th style="width: 25%; text-align: right;"> <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw </th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="3" style="height: 40px;"></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw				
Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw								
		E-mailadres gemachtigde									
1.4	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer									
		Postcode en plaats									
		Postbus, postcode en plaats	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 25%;">616</td> <td style="width: 25%;">6200 MD</td> <td style="width: 25%; background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2h</td> <td style="width: 25%;"></td> </tr> </tbody> </table>	616	6200 MD	5.1 lid2h					
616	6200 MD	5.1 lid2h									
		(Titel) Naam en voorletters	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 25%; background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%;"></td> <td style="width: 25%; text-align: right;"> <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. </td> </tr> </tbody> </table>	5.1 lid2e			<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.				
5.1 lid2e			<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.								
		Functie	5.1 lid2e								
		Afdeling	5.1 lid2h								

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie Afdeling Telefoonnummer E-mailadres
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer 5.1 lid2h E-mailadres 5.1 lid2h
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag <input checked="" type="checkbox"/> Nee

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 <input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 01 - 03 - 2021 Einddatum (t/m) 01 - 03 - 2026
3.2	Wat is de titel van het project?	Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het nabootsen van glaucoom in celkweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan
3.4		Naam DEC 5.1 lid2h Postadres

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres

5.1 lid2h

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:

Afdeling:

Straat:

Huisnummer:

Postcode:

Plaats:

Postbus:

Postcode:

Plaats:

E-mail:

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1
- 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 en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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

5.1 lid2e

Functie

5.1 lid2e

Plaats

5.1 lid2h

Datum

14 - 01 - 2021

Handtekening

5.1 lid2e



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.

The eye disease glaucoma is a leading cause of blindness with an estimated 70 million people affected worldwide, of which 7 million are bilaterally blind (*Weinreb et al. 2014, JAMA 311: 1901-1911*). The pathology is characterized by degeneration of the optic nerve, which disrupts transmission of visual information from the eye to the brain. The etiology is complex, involves multiple tissues and is currently

not completely understood. Important risk factors are age, ethnicity, and elevated intra ocular pressure (IOP). Also, mutations and sequence variants in over 150 genes have been found to be associated with disease risk (*Hubens et al. 2019, Curr Eye Res 44:1006-1017*). For the majority of these genes their role in glaucoma has not been clarified yet. The large number of genes involved suggests that glaucoma is a heterogeneous disease.

All current treatment modalities aim at lowering IOP. While this often retards disease progression, it does not effectively stop disease progression in the long run, even if IOP is successfully reduced. One out of every ten patients is blind at the end of their life.

It is clear then that new treatment options are needed. The optic nerve is composed of the axons of retinal ganglion cells (RGCs) and the loss of these cells represents the irreversible step in the disease process. At 5.1 lid2h we started a research project focussed on these RGCs. We aim to find ways, e.g. drugs or dietary supplements, to prevent their death in glaucoma, preventing vision loss and blindness.

Our research strategy consists of mimicking glaucoma in the laboratory by culturing RGCs and expose them to cell death triggers and risk factors of glaucoma. We will use these *in vitro* glaucoma models to study the cell death mechanism pertinent to this risk factor or cell death trigger, and to develop and test neuroprotective drugs or dietary supplements for this cell death mechanism.

Several labs use this approach to study RGC cell death and to develop potential neuroprotective glaucoma drugs. For example, Welsbie et al. using primary rodent RGCs identified dual leucine zipper kinase (DLK) as a key neuroprotective target in RGCs and showed that tozasertib, a small molecule protein kinase inhibitor, protects RGCs from cell death in rodent glaucoma models (*Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50*). Sappington et al. isolated and cultured primary rat RGCs and exposed these cells to pressure, aiming to mimic the effects of elevated IOP. They identified mechanisms of pathology, therapeutic targets and protective agents, including interleukin 6 and Pigment epithelium derived factor (*Sappington et al. 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci: 7: 2932-42*).

In previous work of our still ongoing PV 5.1 lid2h, we introduced the technique of isolation and culturing of rodent RGCs into our lab. In addition, we made devices to apply mechanical forces to these RGCs in culture. These mechanical forces mimic the effects of elevated IOP, the main risk factor of glaucoma. Current studies in this PV study the molecular changes that occur in RGCs when this trigger is applied. We aim to analyse the molecular pathways activated by this risk factor and find drugs that can protect the RGCs.

As indicated above, glaucoma probably is a very heterogeneous disease. The heterogeneous character of this pathology, involving several molecular pathways, probably implies that there is not one drug that can prevent RGC death in all glaucoma patients. Instead, every different molecular pathway may require its own intervention and medication. For example, while elevated IOP is the main risk factor of glaucoma, there are also glaucoma patients that never experience elevated IOP. Other factors are known to be risk factors or physiological triggers of glaucoma. Important ones are deprivation of neurotrophic factors, glutamate excitotoxicity and mitochondrial dysfunction. Each trigger may activate a different signalling pathway leading to a cell death program.

The aim of this PV is to extend and expand the research started in the previous, still ongoing PV 5.1 lid2h. We will extend the studies on the mechanical glaucoma risk factor and expand with research on other physiological triggers of glaucoma, i.e. neurotrophic factor deprivation and mitochondrial dysfunction. These experiments aim to mimic these factors *in vitro* and to study mechanism and possible treatment. For example, if we can show and model *in vitro* that mitochondrial dysfunction plays a role in glaucoma we can test the neuroprotective effect of drugs or dietary supplements that bolster mitochondrial function (as was recently suggested for vitamin B3 by Williams et al. (2017, *Science 355: 756-60*)).

Apart from studying the mechanism and signalling cascades of specific glaucoma risk factors, we will also study the cell death program itself. Apoptosis probably is the most important cell death program of RGC death in glaucoma (*Quigley, 1995, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: 774-86*). Various triggers can lead to apoptotic cell death of RGCs. Once activated, apoptosis is generally considered to be irreversible, especially in late stages when cell death-executing activities occur. However, recent studies reveal that recovery of dying cells is possible, even after reaching critical cell death events (e.g. *Tang and Tang 2018, R. Soc.*

Open Sci. 5: 180442). This phenomenon is termed anastasis. Promoting anastasis may represent a previously unrecognized mechanism of preserving differentiated cells that are difficult to replace, such as RGCs.

To start answering the question whether cell death of neuronal cells can be reversed, we have performed experiments on cells of the neuronal PC12 cell line with live cell imaging of the known key events in this cell death program, such as Annexin A5 membrane binding (Phosphatidyl-Serine exposition), loss of membrane integrity, mitochondrial membrane potential and cytochrome C leakage, caspase-activation, and nuclear morphology. We have done this by high-end optical microscopy and will soon combine this with transmission electron microscopy. Apoptosis was induced by two well-known pharmacological inducers of cell death, staurosporine and ethanol. The experiments will show whether and up till which stage apoptosis in neuronal cells can be reversed, preventing the cell death. This will be investigated by removing the cell death trigger, and by blocking cell death pathways (e.g. adding caspase inhibitors). When successful in PC12 cells, we intend to repeat these experiments with primary rodent RGCs to show that this approach actually can save RGCs and become relevant for glaucoma.

A general aspect of our strategy is that required methods and techniques will first be set up with a neuronal cell line (e.g. PC12). Cell lines of immortalized neuronal cells have advantages, ethically (no animals required) and practically (cells are readily available). Yet, they differ from the postmitotic RGC that degenerate in glaucoma and there may well be differences in cell death mechanisms and susceptibility between the neuronal cell line and RGCs. Therefore, when all methods have been set up and optimised using the neuronal cell line, we will perform the experiments with primary RGCs isolated from rats to make sure that our studies are relevant for glaucoma.

With the current animal experiment protocol we aim to obtain the primary rat RGCs.

The aims of the overall research project are:

1. Clarify the mechanism of cell death of RGCs in glaucoma
2. Develop new treatments, such as neuroprotective drugs or diets that prevent RGC death.

Our research is both "basic research" and "translational research" as we focus on finding and testing neuroprotective drugs and therapies that can be further developed for clinical trials and for use in the clinic to treat glaucoma.

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?

General aim of the research program is to develop treatments (e.g. drugs, dietary supplements) that prevent loss of RGCs in glaucoma.

Currently, no neuroprotective drugs are clinically available to treat glaucoma. In the present project, we set up *in vitro* models with rodent RGCs using several glaucoma triggers. These models will be used to study the mechanism(s) of glaucoma pathology in these cells. In addition, these models can be used to develop and test possible treatments and drugs.

This objective is achievable because rodent RGCs can be isolated, cultured *in vitro* and exposed to cell death triggers, thus modelling glaucoma. This has been done in other labs, e.g. by mimicking the effects of high IOP *in vitro*, and these techniques are now also operational in our lab.

The mechanism of RGC death can be studied with well-known techniques, such as gene expression profiling and live cell microscopic imaging. These techniques are operational in our laboratory and within our professional network.

In the *in vitro* glaucoma models, neuroprotective agents can be developed and tested. Rodent RGCs are often used with this purpose (e.g. *Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50*). If these agents (drugs, dietary supplements) are effective in the *in vitro* models, clinical trials can be initiated to bring the treatments to the patients.

More details on achievability are given below in "research strategy":

3.3 Relevance

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

1. This project will identify mechanisms of RGC death in a model of glaucoma. This is scientifically of interest for our understanding of glaucoma and for our understanding of survival of neurons in general. Since glaucoma is a multifactorial, heterogeneous disorder, we will study the effects of several glaucoma risk factors and triggers in order to be relevant for a wide range of glaucoma patients.

2. We will study whether the cell death program, once activated, can be stopped and reversed in RGCs (and neurons in general). This reversal of cell death, called anastasis, has been demonstrated for other cell types but not yet for neurons of the central nervous system.

3. We will develop new drugs / dietary supplements for protecting the RGCs (and the optic nerve) of glaucoma patients. In the Netherlands, estimates indicate that 162.500 people have glaucoma. Worldwide, glaucoma affects 70 million people and causes blindness of 7 million people. No cure is available. The only treatment modality is to lower the IOP. Yet, this treatment often does not suffice. End-of-life blindness still amounts to 10% of patients, also in the Netherlands.

3.4 Research strategy

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

General aim of the research program is to develop new treatments to prevent the loss of RGCs in glaucoma. We will do this by mimicking the glaucomatous RGC cell death *in vitro*, study the disease mechanisms and develop and test neuroprotective treatments.

As glaucoma is a multifactorial and probably very heterogeneous disease, we will study 2 different physiological glaucoma triggers (high IOP and mitochondrial dysfunction) and 2 different well-known cell death triggers (e.g. ethanol, staurosporine) to study the possibility of prevention or reversal of the cell death program in RGCs.

General GO / NO GO moments: All individual research projects will first be set up using a neuronal cell line. This serves to solve practical issues and establish experimental protocols. Only when all practical issues are settled, we will use primary rodent RGCs.

The project is divided into 4 work packages:

1. Set up *in vitro* glaucoma models
2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)
3. Develop and test new neuroprotective treatments
4. Study the ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3

Work Package (WP) 1. Set up *in vitro* glaucoma models

This will be first done using cells of a neuronal cell line (e.g. PC12). As soon as the trigger produces consistently and reliably the desired effects on the cells of the neuronal cell line (e.g. cell death, structural and molecular changes) we will start using RGCs to establish this glaucoma model with RGCs.

More in detail:

To set up these models we need

- 1) cultured RGCs
- 2) glaucoma / cell death triggers

Isolation and purification of rodent RGCs have been made operational in our laboratory in the current PV [5.1 lid2h](#)

The rat is most widely used for generating primary RGC cultures and modelling glaucoma (e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*). Therefore, we will use this animal.

Employing the neuronal cell line PC12 (i.e. without use of rodent RGCs), we have already set up several cell death models, using the glaucoma trigger mechanical stress (involved in high IOP, e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*) and cell death triggers such as ethanol and staurosporine (known cell death inducers to study anastasis). We are currently setting up a model of mitochondrial dysfunction, which also is a known glaucoma risk factor (*Williams et al. 2017 Science 6326: 756-60*). We will set up these cell death models in our lab with PC12 cells. When they are fully operational, we will use rodent RGCs, exposing them to these cell death triggers, in order to create more realistic glaucoma models.

GO / NO GO: As soon as a trigger consistently and reliably causes relevant changes in the RGCs (e.g. cell death, structural and molecular changes) we continue to the next step with this model.

WP 2. *Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)*

We basically employ two techniques to study the cell death mechanism:

1. Cell biology: Live cell imaging and pharmacological intervention will be used to monitor in detail the sequence of events in the cell death process.
2. Molecular biology (gene expression). We will perform RNAseq to reveal the molecular events that occur during cell death.

Again, required techniques and *in vitro* models will first be set up and optimized with a neuronal cell line (e.g. PC12). Only when this has been achieved, we will use primary rodent RGCs isolated from rats and mice in these glaucoma models.

GO / NO GO: The outcome of this WP should be that we have candidate targets for neuroprotective drug development in these models. For example, targets in mitochondrial function, neurotrophic support of the cells, or in regulation of caspase activity.

WP 3: *Develop and test new neuroprotective treatments*

Using the information we obtain on RGC cell death in WP 2, we will design new therapies. For example, if caspase is involved in the cell death mechanism, RGCs may be rescued by caspase inhibitors. In addition, we can test whether drugs or dietary components that bolster mitochondrial function, rescue RGCs in the glaucoma model of mitochondrial dysfunction (and the other models).

The experiments will first be set up with PC12 cells. Once successful in PC12 cells, we will perform these experiments with primary rodent RGCs.

We aim to develop 2 drugs candidates for each trigger (i.e. pressure, mitochondrial dysfunction, ethanol and staurosporine).

WP 4: *Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3*

The *in vitro* studies in WP2 will lead to the discovery of proteins and genes that are involved in the cell death of RGCs. To verify their presence in native RGCs and to determine their exact localization and distribution in the eye, we will study their expression in eyes, collected of young (the age of the pups used for RGC isolation) and adult animals (which have a fully differentiated retina). This will be done in parallel with the studies on developing neuroprotective strategies in WP3.

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.

Throughout the project we will employ only one type of animal experiment: Euthanization of rats without prior experimentation. Most of these animals are pups before weaning, while a few adult animals are used in WP4. We will take the eyes in order to isolate and culture the RGCs, that are needed for the specific experiments to develop new glaucoma therapies. In a few sacrificed animals (WP 4) we will use the eyes to study protein/mRNA expression.

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 animal experiments provide the eyes for rodent RGCs needed for the experiments of all 4 work packages of the project. The overall research project currently involves three PhD projects each focusing on a different glaucoma trigger / mechanism: mechanical stress, mitochondrial dysfunction, and reversal of cell death / anastasis). The go-no goes are described in 3.4.1.

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	Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research
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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

Serial number

Type of animal procedure

1

Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

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 the current research project, we focus on retinal ganglion cells (RGCs) since the loss of these specific cells represents the irreversible step in glaucoma pathology. General aim of the research project is to develop new treatments to prevent the loss of RGCs in glaucoma. We will do this by mimicking the RGC cell death of glaucoma *in vitro*, study the disease mechanisms and then develop and test neuroprotective treatments.

In order to model RGC cell death *in vitro*, RGCs are required. In this project, we will employ primary cultures of rat RGCs. (for justification of this choice see below "D, Replacement"). The purpose of the animal procedure described in this appendix is to provide these rat RGCs. The primary output parameter of the animal procedure will be the yield of suitable RGCs for the *in vitro* glaucoma models.

General design of the animal procedures:

The rats are euthanized, without prior experimentation. The eyes are taken out and further processed.

Isolation and purification of the RGCs occurs according to established protocols, that are operational in our laboratory. Next, the RGCs are used in experiments aimed at developing neuroprotective drugs and treatments.

In work packages 1- 3 early postnatal animals will be used since at this stage the yield of viable and well differentiated RGCs is optimal (Winzeler and Wang 2014, *Cold Spring Harb Protoc*; 2013; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961).

In work package 4, also adult animals are used in order to verify the adult expression and localization of molecular targets identified in the current project.

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

Early postnatal rodent pups (postnatal day 0 - 10) will be sacrificed by decapitation.

Adult animals will be first anesthetized and then killed.

After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.

These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

The other organs may be removed and donated to other research projects.

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

As stated in the project proposal form, the animal experiments are needed for 4 different work packages:

1. Set up *in vitro* glaucoma models
2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)
3. Develop and test new neuroprotective treatments
4. Study the ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3

To minimize the number of animals required, we first use immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up and optimize all required techniques. Only if a method or technique is successfully set up using PC12 cells, will we continue with rat cells (GO / NO GO criterium).

GO / NO GO criteria: For each glaucoma model is progression from WP1 to WP2 only possible when WP1 is successfully completed. Similarly, only after completion of WP2, WP3 can be started. WP4 can be done in parallel with WP3.

We will use statistical methods to demonstrate significant effects in our experiments. In the scientific literature of this type of experiments (pathology models using primary rodent RGCs cultures), generally parametric statistical tests (Student's T test, one- and two-sided ANOVA, $P < 0.05$) are used. The sample size is the number of biological replicates, i.e. the number of individual RGC isolations, each using a pool of biologically different retina's to isolate RGCs. Each biological replicate contains sufficient RGCs to allow technical replicates of the measurements in order to keep the standard deviation of the measurement low.

Examining the literature we found that the samples size for this kind of experiments generally is 3 to 7. In rare instances, higher samples sizes are used. Since we are interested in large effects, we are confident that a sample size of max 7 will be sufficient for our project.

A good illustration is a recent study in *J Mol Biol*, on lactate-mediated protection in retinal ganglion cells (Vohra et al 2019, *J. Mol Biol.* 143: 1878-1888). In this study, several different types of experiments were done each demonstrating significant effects, each using different samples sizes, ranging from 3 to 7. Therefore, a sample size of max 7 likely is sufficient for these type of experiments to obtain biologically meaningful results. In our experiments (see below) we will therefore, request sufficient rats to achieve a maximum sample size of 7. Yet, this maximum will not always be needed and we will start the experiments with a lower sample size and see whether this is sufficient to significantly demonstrate the biological effect.

We selected those analysis techniques that generate relatively much information from limited use of animals. These techniques are:

- 1) Live, single cell imaging, which requires less cells than many other, cell biology methods.

2) RNA sequencing to comprehensively analyse the molecular mechanisms of the RGC cell death.

B. The animals

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

Species: rat, wild type

Choice for rats:

The rat is most widely used for generating primary RGC cultures (pioneering work of dr. Barres: *Barres et al. 1988, Neuron 1: 791-803*) and modelling glaucoma (e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*). Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

Origin: We will obtain the animals from certified suppliers or from local breeding.

Life stage:

Early postnatal rats are used since this stage is optimal for providing cultures of viable, well-differentiated RGCs (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961*).

In addition, a limited number of adult animals is required (in work package 4) to determine the localization of expression of proteins, that are found in work package 2 and 3 to be important for RGC cell death.

Strategy for breeding and using pups:

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest. We aim to leave at least 2 pups with the mother. Our method of isolation of RGCs requires a minimum of 4 pups (8 retina's) for each isolation, which means that we would like to have at least 6 pups per litter. This generally will be the case (we use the strain Sprague Dawley which has average litter size of 10.5). In addition, we can use more than one breeding pair if we need many pups. Yet, there always is the possibility that there will be less than 6 pups born. If there are less than 4, we cannot and will not perform the experiment. If there are 4 or 5 pups born, we will choose to use the complete nest. This will lead to discomfort to the mother but otherwise would lead to 4 to 5 pups being killed without use. We expect that this situation (a single litter of 4-5 pups) will not happen often. For calculating the number of animals required we will assume it happens 1 out of 10 experiments.

In addition, we will try to re-use the mothers as much as possible.

Estimated numbers:

The number of animals required was estimated on the basis of our pilot studies and previous published studies in the literature using similar materials, methods and research questions. As indicated above, a maximum of sample size of 7 apparently is sufficient for most of these experiments to obtain meaningful results.

Also relevant is the yield of RGCs per rat. Yields of RGCs according to the published protocols (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906*) are 30,000 cells for early postnatal rat retina. In our hands, the yield of RGCs were on average approximately 20000 viable RGCs per retina, which means 40000 RGCs per animal, for use in our experiments.

Calculation of the numbers of animals needed for the experiments:

The rat RGCs are needed for multiple, diverse studies. In the project proposal form we listed the following 4 work packages (WP):

WP 1. Set up in vitro glaucoma models

WP 2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

WP 3. Develop and test new neuroprotective treatments

WP 4. Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3

WP 1: Set up in vitro glaucoma models

Max 168 pups required

Calculation: We will set up glaucoma *in vitro* models with the following triggers: 1) mechanical stress, 2) mitochondrial dysfunction, 3) ethanol and 4) staurosporine. For each of these models, we will first set up all techniques using PC12 cells. After that, we will perform experiments with primary RGCs to explore the sensitivity of RGCs for the trigger and select the optimal conditions for the trigger.

To measure the effect of the cell death triggers, we examine cells seeded on coverslips. Each coverslip is seeded with 20000 cells. One coverslip is required for cell death assessment; a second coverslip is used for morphology. Multiple positions on the coverslip will be imaged in order to get a fair estimate of the effect of the trigger. For each glaucoma model, we aim to find the conditions of the experimental parameters that define max. 6 experimental groups, including the control. For example for mechanical stress, we expect to use hydrostatic pressure of 0, 35 and 70 mmHg, with two durations (e.g. 8 hrs and 24 hrs), which means 6 experimental groups. For each group two coverslips are needed for assessment: We need 12 coverslips for one independent experiment, performed with cells from one independent RGC isolation. We will use max seven experiments to set up and establish each disease model.

Calculation:

Each cell death trigger: max. 84 coverslips, each containing 20000 cells. Isolation of RGCs of rats of postnatal day 7 yields 40000 cells per rat. Per trigger 42 pups are required.

In total for 4 triggers: $4 \times 42 = \text{max. } 168$ pups

WP 2: Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

- WP 2A: Cell biology/live-imaging: max 42 pups

We will study the cell death process in each disease model in detail with live cell imaging using light microscopy and correlative electron microscopy. In these live imaging experiments, single cells are examined (simultaneously various single cells at several positions). Our pilot experiments with PC12 cells have shown that 10000 cells per slide are sufficient to obtain an adequate cell sampling for reliable measurement. In each imaging session, six conditions are imaged (control, plus five experimental conditions for assessing the cell death mechanism). This means that cells of 3 eyes are required for each imaging experiment. We will replicate each imaging experiment max 7 times with independent RGC isolations in order to document the involved cell death program. To study this in four disease models, we require in total 42 pups.

- WP 2B: Molecular biology / biochemistry: max 504 pups

Biochemical experiments (RNAseq) will be done for the cell death triggers (4) and various time points (max 2) and trigger strengths (max 3, including the control).

For RNAseq, 1 microgram totalRNA is required for each sample. Pilot experiments with PC12 cells have indicated that this amount of RNA can be obtained from 80000 cells. In parallel, for each sample we will measure the effects on cell death and morphology using 2 separate coverslips (20000 cells). Per sample we thus require in total 120000 cells (3 pups) for one experimental condition. Per cell death model, we will use maximally 6 experimental conditions (i.e. max 3 trigger strengths and max 2 time points). To measure these 6 conditions, 18 pups are required for sample size $N=1$.

We will use one way or two way ANOVA design to analyse the effects. We will use a sample size of max $N=7$, aiming to discover the major molecular mechanisms of each cell death model.

Per cell death trigger we thus need 7×18 is 126 pups.

For 4 cell death models we require 504 pups.

WP 3: Develop and test new neuroprotective treatments.

Max 760 pups

To prevent or reverse cell death by the different glaucoma triggers, different drugs / dietary supplements will be tested for the different triggers (e.g. mechanical stress, apoptosis / anastasis). We will test these drugs in the glaucoma models by using cell death and morphology as output parameters.

One experiment to test one drug consists of 3 drug concentrations (i.e. two drug concentrations and the blank control), 3 conditions of the trigger (e.g. mechanical stress: 0, 35 and 70 mmHg), one time point (e.g. 24 hrs), 3 coverslips of 20000 cells to measure the output parameters (e.g. cell death measurements, morphology). This means 27 coverslips. We will use max 7 biological replicates with independent RGC isolations. In total, one experiment to test one drug in one glaucoma model would then require max 189 coverslips of 20000 cells, requiring 95 pups.

Testing 8 drugs (2 drugs per trigger) requires max 760 pups.

WP 4: Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3.

Max 42 animals required: 21 pups and 21 adult rats.

In order to establish the native ocular expression and localization of glaucoma proteins we will employ the following methods: immunohistochemistry, in situ hybridisation, western blotting and mRNA analysis. In this experiment no statistical testing is needed. We expect to need a sample size of max. N=7 to obtain solid results.

For immunohistochemistry and in situ hybridisation combined, we will use max 7 pups and 7 adult rats to achieve a sample size of N=7. For western blotting we will use two eyes (one rat) for each biological replicate, requiring in total. max 7 pups and max 7 adult rats. In addition, for mRNA expression we will use max 7 pups and 7 adult rats.

In total, for this work package we request 21 pups and 21 adult animals).

Calculation of the total number of animals required: 1607 rats

- Pups: max 1570

Explanation: Data of max 1495 pups are needed for WP 1, 2, 3 and 4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances we calculate 5% extra animals: in total 1570 pups are requested.

- Mother rats with discomfort: 15

Explanation: An estimated 15 mother rats will experience discomfort because their full nest is taken away for use in experiments (if the nest contains 4-5 pups, see above). To calculate this number we assume that we will use Sprague Dawley rats for the experiments with an average nest size of 10.5 pups. For 1570 pups we need 150 nests. With an assumed frequency of one out of 10 nests that has 4-5 pups, we will then cause discomfort in 15 mother rats.

- Adult Rats: 22

Explanation: Max 21 adult rats are calculated for WP4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances, we calculate 5% extra animals: 1 extra animal.

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.

We intend to re - use the mothers for breeding. In a small percentage this may result in mild discomfort in case all offspring are used.

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:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments.

There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Yet, we will use neuronal cell lines (PC12) to set up all required techniques. After that, however, these experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma.

It is practically not feasible to isolate and culture human retinal ganglion cells because of lack of fresh post-mortem eye tissue. In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or from human induced pluripotent stem cells (IPSCs), despite many recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (of Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human IPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rodent RGCs. However, for now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

The retinal ganglion cells are post mitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The whole procedure needs to be standardized in detail. It requires fresh material of standardized age and species. Waste tissue from the abattoir does not meet these criteria.

Reduction:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments are done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped.

All experiments that we will perform on rodent RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (PC12).

We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful.

It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.
- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).
- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.
- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").
- We will use the mothers more than one time if possible.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible.

We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Refinement:

Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for

glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently.

We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals.

The choice for our *in vitro* approach, implies that no *in vivo* glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used.

Application of bio-informatics for *in silico* analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test *in silico* potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments.

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".

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

We will apply general anaesthesia for adult animals.

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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Since no treatment is imposed (other than the sacrifice of the animals), adverse effects on animals' welfare are not expected.

Stress may occur in the mothers when pups are taken away. To avoid this, we will try to use local breeding and re-use mothers. We expect that it will be often possible to use only a part of the litter for RGC isolation (see above). This reduces the stress for the mother and the remaining pups can be used for future breeding or other experiments.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

See above

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').

'Mild': For 100% of the animals since they are euthanized for collection of eye tissue, or, in case of the mothers, if all pups are taken away.

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.

It is necessary to kill the animals in order to collect the eyes.

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

Naam van het project	Het nabootsen van glaucoom in celkweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan
NTS-identificatiecode	NTS-NL-101794 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	glaucoom retinale ganglion cell celkweek oogzenuw blindheid
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren) Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van zintuigorganen (huid, ogen en oren) bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>De oogziekte glaucoom wordt gekenmerkt door schade aan de oogzenuw, hetgeen leidt tot vermindering van het gezichtsvermogen en blindheid. De ziekte komt veel voor en heeft grote impact. Wereldwijd lijden naar schatting 70 miljoen mensen aan deze ziekte waarvan er 7 miljoen blind zijn.</p> <p>Het is nog onduidelijk hoe de ziekte precies ontstaat. Bekende risicofactoren zijn leeftijd, aanleg, etnische achtergrond en een hoge druk in het oog. Op dit moment bestaat de behandeling uit het geven van oogdruppels en chirurgische ingrepen die als doel hebben om de druk in het oog te verminderen. Helaas kan dit de ziekte vaak niet helemaal stoppen en blijft het gezichtsvermogen achteruitgaan: Aan het eind van het leven is 10% van de glaucoompatiënten blind aan beide ogen, ook in Nederland.</p> <p>Het huidige project zoekt nieuwe behandelmogelijkheden. De achteruitgang van het gezichtsvermogen is het directe gevolg van het afsterven van de gespecialiseerde zenuwcellen in het oog, die de lichtprikkels van het oog naar de hersenen geleiden. Deze zenuwcellen, de zogenaamde retinale ganglion cellen, kunnen niet vervangen worden als ze verloren gaan. Zo neemt met elke cel die verloren gaat, telkens het gezichtsvermogen een beetje af.</p> <p>Het doel van dit onderzoek is geneesmiddelen en/of voedingssupplementen te identificeren die deze cellen beter te beschermen. Onze aanpak is als volgt: We isoleren deze gespecialiseerde cellen uit het netvlies van proefdieren, houden deze in het laboratorium in leven en stellen ze bloot aan factoren, waarvan we weten dat ze een rol spelen bij glaucoom. Zo bootsten we bijvoorbeeld de effecten van hoge oogdruk in het laboratorium na. In dit glaucoommodel onderzoeken we dan heel gedetailleerd hoe en waarom de cellen doodgaan en welke behandeling dit kan tegengaan. Het doel is om geneesmiddelen of voedingssupplementen te ontwikkelen die deze cellen en de oogzenuw beschermen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk	<p>Het project heeft de volgende verwachte opbrengsten:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Kennis van de moleculaire processen die bij glaucoom in de retinale ganglion cellen optreden en die leiden tot het afsterven van deze cellen. Dit is wetenschappelijk van belang. 2) Mogelijke geneesmiddelen of voedingssupplementen die deze cellen en de oogzenuw beschermen bij glaucoom. Dit vertraagt het verlies aan gezichtsvermogen en kan blindheid uitstellen

voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

of voorkomen en is van groot maatschappelijk belang. De kandidaat-geneesmiddelen kunnen vervolgens in klinische trials worden getest.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren worden gedood zonder voorafgaande handelingen ten behoeve van het verkrijgen van de gespecialiseerde oogcellen.</p>				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De dieren worden in het kader van de proef gedood. Dit gebeurt door middel van euthanasie, uitgevoerd door gekwalificeerd personeel, waardoor pijn en stress minimaal zal zijn. Voorafgaand aan de euthanasie wordt geen ongerief verwacht omdat de dieren gefokt, gehuisvest en verzorgd worden door gekwalificeerd personeel onder gecontroleerde en goede omstandigheden. Een klein deel van de moederdieren zal stress ervaren wanneer pups uit het nest worden genomen. Alle noodzakelijke handelingen worden ook door gekwalificeerd personeel uitgevoerd.</p>				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>		
<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>1607</p>	<p>0</p>	<p>Licht</p> <p>1607</p>	<p>Matig</p> <p>0</p>	<p>Ernstig</p> <p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>			
<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>15</p>	<p>Hergebruikt</p> <p>15</p>	<p>Teruggeplaatst</p> <p>0</p>	<p>Geadopteerd</p> <p>0</p>	
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden in het kader van de proef gedood. Het doel van de proef is om gespecialiseerde netvliescellen te verkrijgen. Hiervoor is het noodzakelijk de dieren te doden en de ogen uit te nemen. Moederdieren worden meermaals gebruikt voor het genereren van pups.</p>				

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De onomkeerbare stap in glaucoom is de celdood van de retinale ganglion cellen. Daarom richt het project zich op deze gespecialiseerde netvliescellen. Deze gespecialiseerde cellen kunnen niet lang in het laboratorium in leven gehouden worden (en ze kunnen zich niet vermeerderen) en moeten regelmatig uit proefdieren geïsoleerd worden. Slachtafval voldoet niet als bron voor de cellen omdat het bronweefsel heel vers moet zijn en alle omstandigheden precies gestandaardiseerd moeten zijn om de kweek van deze kwetsbare cellen te doen slagen en de variatie beperkt te houden. Ook humane donorogen kunnen niet vers genoeg verkregen worden voor succesvolle isolatie en kweek van retinale ganglion cellen. Op dit moment is het nog niet mogelijk om goed gediifferentieerde humane retinale ganglion cellen te verkrijgen d.m.v. stamceltechnologie en zijn de retinale ganglion cellen uit proefdieren de standaardcellen voor dit type onderzoek. Er zijn geen onsterfelijk gemaakte cellijnen beschikbaar voor deze gespecialiseerde netvliescellen. Daarom zullen we de uiteindelijke proeven moeten doen met retinale ganglion cellen verkregen uit proefdieren. Wel is het mogelijk om onsterfelijk gemaakte cellijnen te gebruiken om de proeven met de retinale ganglion cellen van ratten zo goed mogelijk voor te bereiden. Op deze manier zullen we het aantal gebruikte proefdieren zo laag mogelijk houden.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Statistische methoden worden gebruikt om het aantal proefdieren zo klein mogelijk te houden. Voor onze experimenten gebruiken we alleen de ogen. De andere weefsels kunnen door andere onderzoekers gebruikt worden. Omgekeerd, kunnen we ook oogweefsel gebruiken van andere dierexperimenten als het aan onze criteria voldoet. Daarnaast maken we gebruik van bio-informatica programmatuur om zo goed mogelijk te voorspellen welke geneesmiddelen voor ons doel het meest geschikt zijn om het aantal experimenten waarvoor proefdieren nodig zijn tot het minimum te beperken. In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen (RNA-seq, live cell imaging) die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen (RNA-seq, bio-informatica, live cell imaging) die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren. Door te kiezen voor een in vitro benadering is geen in vivo glaucoomdiermodel met bijbehorend ongerief nodig. Het verzamelen van pups voor het spenen kan voor de moeders ongemak veroorzaken. We zullen proberen dit ongemak te minimaliseren door lokale kweek te gebruiken en niet het volledige nest te gebruiken, maar slechts een deel van het nest.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We kiezen voor de rat als proefdier om verschillende redenen. Dit proefdier is goed vergelijkbaar met de mens en retinale ganglion cellen van de rat kunnen goed model staan voor de humane netvliescellen. Er is een grote kans dat als een geneesmiddel in de cellen van dit proefdier werkt, dat het dan ook gebruikt kan worden om een therapie voor de mens te ontwikkelen. Bovendien zijn veel kennis, expertise en ook technische hulpmiddelen beschikbaar voor deze diersoort. We zullen jonge, nog ongespeende ratten gebruiken omdat deze leeftijd het beste is om een goede opbrengst aan netvliescellen voor de celweek te verkrijgen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: donderdag 14 januari 2021 13:48
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114405
Bijlagen: PV2020_008_5.1 lid2e_Aanvraag_IvD.pdf; PV2020_008_5.1 lid2e_Projectproposal_IvD.docx.pdf; PV2020_008_5.1 lid2e_Appendix1_IvD.pdf; PV2020_008_5.1 lid2e_NTS_IvD.xlsx

Geachte leden van 5.1 lid2h

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening advies te geven over het project met als titel: "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202114405.

Uw commissie wordt verzocht op grond van artikel 10.a.2 van de Wet op de dierproeven de aanvraag te beoordelen en een ethische toetsing uit te voeren waarbij wordt afgewogen of de doelstelling van het project, de verwachte voordelen voor mens, dier of milieu en de haalbaarheid van de doelstellingen, het gebruik van dieren en de schade die zal worden toegebracht aan de dieren in de vorm van lijden, pijn en angst kan rechtvaardigen.

Graag ontvangen wij van u bericht dat deze e-mail goed is ontvangen en wanneer u dit advies in de vergadering gaat bespreken.

Voor het in te dienen advies dient de DEC gebruik te maken van de meest actuele versie van het op de website van de CCD gepubliceerde Format DEC-advies en de toelichting daarbij. U dient deze aanvraag vertrouwelijk te behandelen. Voor de communicatie met de CCD dient u gebruik te maken van FileSecure.

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 14-01-2021, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommekeer per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager wordt de termijn opgeschort en geeft u in uw advies aan wanneer dit is geweest. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt. Mocht u verwachten door een andere reden dan opschorting uw advies later dan 20 werkdagen na 14-01-2021 bij de CCD in te dienen, dan verzoeken wij u dit direct aan de CCD te melden.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

5.1 lid2h Advies AVD 5.1 lid2h 202114405; PV 2020-008/5.1 lid2e

Preambule

De 5.1 lid2h verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de 5.1 lid2h

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 5.1 lid2h
2. **Titel van het project:** *Modelling glaucoma in cell culture to develop new therapies.*
3. **Titel van de NTS:** Het nabootsen van glaucoom in celkweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan.
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. **Contactgegevens DEC:** 5.1 lid2h, contactpersoon: 5.1 lid2e
5.1 lid2h, e-mailadres: 5.1 lid2h
6. **Adviestraject (data dd-mm-jjjj):**
 - ontvangen door DEC op 14-01-2020
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken op 22-01-2020
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en)
 - a. van 26-01-2021 tot 20-04-2021 (toelichtingsvragen gesteld)
 - b. 27-04-2021 (nationale feestdag)
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag op
 - advies aan CCD op 03-05-2021
7. **Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.**

De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** n.v.t.
9. **Correspondentie met de aanvrager**
 - Datum: 26-01-2021
 - Gestelde vragen: zie bijlage I
 - Datum antwoord: 20-04-2021
 - Verstrek(e) antwoord(en): zie bijlage I
 - De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag
10. **Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC):** n.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. **Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.** JA
2. **De aanvraag betreft** een nieuwe aanvraag.
3. **Is de DEC competent om hierover te adviseren?** JA
4. **Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies, licht toe waarom.** NEE

C. Beoordeling (inhoud)

1. **Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft** (Zie handreiking 'Invulling definitie project').

Deze aanvraag lijkt de meeste kenmerken te hebben van voorbeeld 1 uit de Handreiking 'Invulling definitie project'. In het project worden primaire 'retinale ganglioncellen' (RGCs) uit ratten-ogen gebruikt om in vitro te onderzoeken welke mogelijkheden er zijn om de (te vroege) dood van deze cellen te remmen. Dat is nuttig omdat het afsterven van deze cellen ten grondslag ligt aan glaucoom; het proces waarbij de oogzenuw beschadigd raakt. Die beschadiging wordt in feite veroorzaakt door de afstervende axonen van de RGC's. Het proces van apoptose wordt niet alleen veroorzaakt door verhoogde vloeistofdruk in het oog; er kunnen velerlei oorzaken zijn. Het doel is een aantal van die oorzaken te ontrafelen. Men richt zich in dit onderzoek ook nadrukkelijk op het apoptose-proces in de RGCs in de verwachting dat dit ook 'targets for treatment' zal opleveren.

Als er bruikbare targets worden gevonden zal in de latere fase van dit project ook gewerkt worden aan mogelijke therapieën en aan het onderzoeken van de expressie van deze targets in RGCs. De aangevraagde dieren worden alleen als donor van retina-like cellen gebruikt.

De onderbouwing van de noodzaak van gebruik van dieren is voldoende en is passend binnen deze aanvraag. De 5.1 lid2h heeft er vertrouwen in dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang ervan en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Zo komt de 5.1 lid2h tot de conclusie dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. **Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort** (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Voor zover de 5.1 lid2h de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere wettelijke bepalingen aanwezig te achten.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek omdat het project zowel kennis brengt van de moleculaire processen die bij glaucoom in de retinale ganglioncellen optreden (leidend tot het afsterven van deze cellen) alsook mogelijke geneesmiddelen en voedingssupplementen die deze cellen en de oogzenuw beschermen bij glaucoom. De kandidaat-geneesmiddelen/methoden kunnen vervolgens in klinische trials worden getest.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4).

Het directe doel van het project is het opzetten van in vitro studies met retinale ganglioncellen afkomstig van ratten. In deze modellen wil men de mechanismen die ten grondslag liggen aan glaucoom-pathologie, in het bijzonder het mechanisme van afsterven van retinale ganglioncellen, bestuderen met als uiteindelijk doel behandelingen en medicijnen te testen ter bestrijding van glaucoom.

Er is binnen dit project een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De 5.1 lid2h acht het waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel binnen bereik ligt binnen de duur van dit project.

De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat er een grote behoefte is aan specifieke medicamenten ter behandeling van neurodegeneratieve aspecten van glaucoom.

De 5.1 lid2h is van mening dat het onderzoek naar neuropathologische aspecten van glaucoom en zoektocht naar (helende) interventies daarop gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld).

De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de neuropathologische oorzaken van glaucoom en de mogelijke interventies daarop zijn de proefdieren, de onderzoekers/wetenschap en de patiënten met glaucoom.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn:

De integriteit van de dieren zal worden aangetast doordat ze gebruikt worden als donoren van retinale cellen.

Waarden die voor onderzoekers en de wetenschap bevorderd worden:

De onderzoekers zullen kennis verkrijgen van de neuropathologie achter glaucoom en de mogelijke farmacologische interventie daarop. Hier zullen wetenschappelijke publicaties uit voortvloeien op basis waarvan de medisch-wetenschappelijke wereld een relevante verbreding van het therapeutisch arsenaal kan verkrijgen.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden:

Verbeterde kennis over de onderliggende werkingsmechanismen van glaucoom om op basis daarvan een verbeterde behandeling te ontwikkelen richting kliniek, is voor toekomstige patiënten van substantieel belang. Aangezien glaucoom een ernstige invaliderende aandoening is die bij 10% van de aangedane patiënten tot blindheid leidt, zou een nieuwe effectievere therapie belangrijke winst betekenen.

- 6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.**

Voor zover de 5.1 lid2h de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

- 7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5).**

Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep volop aanwezig gezien de jarenlange ervaring met RGC-modellen. Het werk is een logische voortzetting van een eerder project 5.1 lid2h waarin de techniek van RGC isolatie en *in vitro*-kweek werd opgezet, gevolgd door ontwikkeling van ingrepen die het glaucoomproces nabootsen. Er wordt ook helder beschreven hoe het werkveld zich wereldwijd ontwikkelt en dat dit project in de frontlinie van het glaucoom-onderzoek staat.

- 8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6).**

De 5.1 lid2h is ervan overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten aangaande de hoofdoorzaak van glaucoom. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. Er is parallel ook ruime aandacht voor het ontwikkelen van vervangende methoden gebruikmakend van 'induced pluripotent stem cells'. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de 5.1 lid2h leiden tot het behalen van de doelstellingen in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod) voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1).

- Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e, lid 2)
- Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

Niet van toepassing.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

De dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de standaard richtlijnen in de *Directive 2010/63/EU*. De **5.1 lid2h** heeft zich hiervan verzekerd op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de IvD als de aanvrager (zie punt F in de bijlage).

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).

De **5.1 lid2h** acht het ongerief, mild ongerief bij 100% realistisch ingeschat, zoals nader gepreciseerd in bijlage 1 sectie K. Waar in de **5.1 lid2h** discussie over was is de inclusie van 14 moederdieren die (mild) ongerief zouden ondervinden door het wegnemen van alle pups vóór speenleeftijd. Naar beste weten van de DEC-leden valt dit onder fok, en fok is geen dierproef.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2).

De integriteit van de dieren zal worden aangetast doordat ze gedood worden om retinale cellen te isoleren voor een primaire celkweek. De jonge pups (4-10 dagen oud) worden direct gedecapiteerd, de volwassen dieren worden onder verdoving gedecapiteerd.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Er is geen sprake van experiment-gerelateerde humane eindpunten.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Dit punt is uitgebreid besproken en de onderzoekers zijn hierop ook nog bevraagd. In hun antwoord konden zij goed onderbouwen dat er op dit moment nog geen bruikbaar alternatief is waarmee de doelstellingen van de proef behaald kunnen worden. Geschikte cellijnen (of stamcellen) ontbreken. Het project (onder background) is verder verduidelijkt op dit punt. De motivatie bestaat uit 3 punten:

- (i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.
- (ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.
- (iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucommodellen.

Punt (i) van de aangevulde motivatie werd nog even betwijfeld door één van de DEC-leden, maar op basis van een schriftelijke ronde onder de DEC-leden is de consensus toch dat de argumenten van de onderzoeker overtuigend zijn. Zij werken zelf mee aan een kantelpunt in dit onderzoek richting gebruik van humane cellen en dan ook naar een afbouw van proefdieren, maar de 5.1 lid2h is overtuigd dat het kantelpunt op dit moment nog niet helemaal bereikt is, en dus zijn voorlopig ook nog de 'oude' testen op primaire cellen afkomstig van ratten nodig.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Ook op dit punt zijn de onderzoekers kritisch bevraagd (zie vragen Appendix 1/B. De dieren/vragen1-4). Op basis van de antwoorden is de 5.1 lid2h van mening dat het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en ook zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een beschreven doelen.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Niet van toepassing. Er worden geen experimentele handelingen op de dieren verricht.

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

Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3).

Naar de mening van de **5.1 lid2h** is dit genoegzaam beschreven in de project-aanvraag door de aanvrager, want de dieren worden gedood in het kader van de proef (isolatie van retinale cellen).

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

Niet van toepassing.

NTS

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

Naar de mening van de **5.1 lid2h** is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A).

Weegt in het voorgestelde onderzoek naar het nabootsen van glaucoom in gekweekte retinale ganglioncellen middels fysiologische glaucoombevorderaars en celdoodbevorderende stoffen, en de mogelijke remmende werking van medicatie en voedingssupplementen op het celdoodmechanisme in glaucoom, op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B).

- **Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn:** licht nadeel.
- **Waarden die voor de onderzoekers en wetenschap bevorderd worden:** substantieel voordeel.
- **Waarden die voor de medische wetenschap bevorderd worden:** substantieel voordeel.
- **Waarden die voor de glaucoom patiënt bevorderd worden:** reëel voordeel.

De ratten ondergaan slechts zeer beperkt ongerief gedurende hun leven, omdat ze niet onderworpen worden aan experimentele interventies. De enige interventie is het doden (pups en volwassen ratten) en verdoven voor doden (volwassen ratten). De aantasting van de integriteit van de ratten is beperkt voor de pups tot het niet kunnen leiden van een natuurlijke levensloop inclusief soortspecifieke gedragingen, en voor zowel pups als volwassen ratten het gedood worden.

De onderzoekers geven aan dat wereldwijd 70 miljoen mensen leiden aan glaucoma, waarbij 10% uiteindelijk blind wordt. In Nederland gaat het om 162.500 mensen met glaucoma.

De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen met glaucoom zwaarder weegt dan de belangen/waarden van de proefdieren.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C).

De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag (zie hierboven punt 1.) bevestigend. De **5.1 lid2h** heeft verschillende vragen gesteld over het voorstel, zie hieronder in bijlage I. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verder ontwikkelen van een model om de mechanistische oorzaak van glaucoom te onderzoeken en deze kennis vervolgens te gebruiken voor de ontwikkeling van therapieën. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen en te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "*Modelling glaucoma in cell culture to develop new therapies*" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** dit projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A).

Het uitgebrachte **5.1 lid2h** advies betreft een meerderheidsstandpunt. Eén lid nam een minderheidsstandpunt in. De argumentatie hierbij was dat de aanvraag niet lijkt te voldoen aan de 'V' van Vervanging. Volgens de nieuwste inzichten en technieken kunnen mature RGCs (blijkens bijvoorbeeld BRN3A and RBPMS expressie) ook verkregen worden uit hIPSCs, middels THY1 (Rabesandratana et al., 2020). Gezien het startpunt van de intrinsieke waarde van het dier, vervalt overeenkomstig dit minderheidsstandpunt de noodzaak tot het gebruik van ratten RGCs *ex vivo*.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B).

Een knelpunt was de vraag of het PV wel voldeed aan de 'V' van Vervanging (zie E2).

Bijlage I:

Vragen 5.1 lid2h d.d. 26-01-2021 en Antwoorden VO d.d. 20-04-2021

I. Vragen op projectniveau over het design

3.1 Achtergrond

1. De 5.1 lid2h vraagt om de onderzoeksresultaten vanuit PV 5.1 lid2h te beschrijven in de achtergrond, zodat duidelijk wordt wat de rationale van huidige aanvraag is.

We hebben het volgende toegevoegd aan de achtergrond: "This application builds on our previous research including PV 5.1 lid2h

The overall aim of this project proposal was to investigate the molecular pathophysiology of glaucoma in view of new drugs. The strategy to achieve this was to set up primary culture of retinal ganglion cells (RGCs) and to set up in vitro models for glaucoma.

In PV 5.1 lid2h we did the following experiments:

- (i) Make the protocol for isolation and purification of rat RGCs operational. We paid a working visit to the lab (Stanford), where this, commonly used, method was developed. We then set up this method in our lab in 5.1 lid2h
- (ii) We have tested and compared a number of variants of this method. A purification step with magnetic beads containing anti-Thy1 antibodies turned out to be an improvement over the original protocol.
- (iii) To obtain the pups, we first had pregnant rats from the Brown Norway strain transported to 5.1 lid2h This was not ideal. Sometimes few or no pups were born. This rat strain is known for small nests. When a breeding of Sprague-Dawley rats was set up in 5.1 lid2h, we decided to switch to this strain. This improved the supply and this strain has additional advantages that the nests are large and the strain is widely used and results can be readily compared with the results of other labs.
- (iv) We have set up a number of in vitro models for glaucoma with PC12 cells, such as a model in which pressure is increased, to simulate the effect of high eye pressure. In this pressure model we used rat RGCs. The cells are grown on slides that are coated (PDL and laminin) in order to enable a good adhesion of the cells. It turned out that the coating of the slides that we optimized for the PC12 cells is in practice unsuitable for the RGCs, which do not adhere properly. Subsequently, we tested and compared different coatings for PC12 cells and for RGCs for use in experiments with mechanical stress (publication in preparation).
- (v) Experiments on the influence of pressure on RGCs are currently taking place but have not yet been completed, partly due to Covid-19 limitations. Hopefully this work can be completed within PV 5.1 lid2h (until July 1, 2021).

2. Sulfonamide gebaseerde *carbonic anhydrase* remmers zoals bijvoorbeeld Acetazolamide worden vaak gebruikt om IOP te verlagen. De 5.1 lid2h vraagt om te onderbouwen waarom geneesmiddelen niet succesvol zijn om het ziekteproces te stoppen aan de hand van dit voorbeeld.

In zijn algemeenheid: dat de huidige glaucoombehandelingen, incl. geneesmiddelen (oogdruppels), onvoldoende succesvol zijn blijkt uit het feit dat bij overlijden 10% van de glaucoompatiënten blind is aan beide ogen ondanks behandeling, ook in Nederland. Hierin spelen een aantal factoren een rol:

- (i) De medicatie moet "levenslang" genomen worden. In de praktijk is dit vaak moeilijk te realiseren: Ze kunnen bijwerkingen hebben, bij sommige patiënten treedt gewenning of overgevoeligheid op of ze verdragen de middelen niet. Als dit optreedt kan als laatste redmiddel overgegaan worden op chirurgie, om een doorgang te maken voor drainage van kamerwater, maar ook dit leidt ook niet altijd tot blijvende oogdrukdaling. In de praktijk kan een fibrotische reactie de afvoer van het kamerwater blokkeren.
- (ii) De ziekte glaucoom is heterogeen. Er zijn meer dan 200 genen die de gevoeligheid voor glaucoom beïnvloeden. Zo zijn er glaucoom patiënten die geen verhoogde oogdruk hebben. Ook werken sommige geneesmiddelen bij de ene patiënt beter dan bij de andere.
- (iii) Bij veel patiënten gaat de progressie van glaucoom door ondanks succesvolle verlaging van de oogdruk. Een van de mogelijke verklaringen hiervoor is dat de hoge oogdruk de retinale ganglion cellen beschadigt en een immuunreactie uitlokt die vervolgens doorgaat ook als de oogdruk weer genormaliseerd is.

Specifiek over uw voorbeeld: Het voorbeeld wat u noemt (Acetazolamide) kan als diamox gegeven worden. Dit middel heeft veel bijwerkingen (o.a. diurese) en wordt zelden langdurig verdragen. Carbonic anhydrase remmers kunnen ook topicaal toegediend worden middels oogdruppels. Deze oogdruppels hebben een hoge intolerantie (een middel heeft b.v. een pH van 5.5) en lage werking. In de praktijk worden bij patiënten verschillende klassen oogdruppels geprobeerd en gecombineerd, maar biedt dit voor veel patiënten niet blijvend soelaas. Aangezien de huidige behandelwijzen tekort schieten, proberen we in dit project behandelwijzen voor glaucoom te ontwikkelen, die complementair zijn aan de oogdruk verlagende middelen. Wij richten ons in dit project direct op de retinale ganglioncel. We willen proberen deze cellen te beschermen en te voorkomen dat ze verloren gaan.

We hebben dit in de tekst nu iets uitgebreider besproken: "All current treatment modalities aim at lowering IOP. First, this will be tried by using medication (eye drops). If these are not effective, no longer effective or not well tolerated, surgery can be applied to increase drainage of aqueous humor and to achieve IOP reduction. Surgery, however, is also not successful in all patients, mainly because of fibrosis during wound healing, which may obstruct drainage of aqueous humor. In addition, it is important to note that even if IOP is successfully reduced, still the progression of the disease often continues. A possible reason for this is that the damage caused by high IOP will elicit a noxious, immune reaction which continues even after the IOP has returned to normal values. Taken together, the current state-of-the-art treatments cannot prevent that one of every ten patients is blind at the end of their life, also in the Netherlands. "

3. De 5.1 lid2h vraagt zich af of een terugdraaien van apoptose niet tot "senescence" van de cellen leidt, hetgeen blijktbaar ook een rol in de pathofysiologie van glaucoom speelt (zie bijvoorbeeld DOI: 10.1111/acle.13089).

Een interessante en voor glaucoom zeker ook relevante vraag. We hebben al gezien met de comet assay dat PC12 cellen in onze celdoodmodellen veranderingen in de celkern vertonen die reversibel lijken als de celdood trigger wordt weggenomen. Het is de vraag of deze cellen dan volledig functioneel kunnen herstellen. Ook interessant is wat er gebeurt als we PC12 cellen aan een glaucoomtrigger blootstellen en tegelijkertijd het apoptose mechanisme blokkeren? Als we een goed model voor het testen van senolytische geneesmiddelen op kunnen zetten (met PC12 cellen) zullen we dit ook met RGCs uitvoeren.

3.2 Doel

4. Het doel van deze projectvergunningaanvraag lijkt niet duidelijk te zijn. Indien correct geïnterpreteerd, lijkt het doel voor de 5.1 lid2h eerder het isoleren van RGC. Kunt u dit nader toelichten?

Mijn excuses dat deze verkeerde indruk is gewekt. Terwijl het doel van de proefdierhandeling is om de retinale ganglioncellen te verschaffen voor het onderzoek, heeft de projectvergunningaanvraag tot doel om middels celweekmodellen voor glaucoom geneesmiddelen/voedingssupplementen te ontdekken die de retinale ganglioncellen kunnen beschermen.

Ik heb dit als volgt duidelijker gemaakt: In de project proposal stond de zin "With the current animal experiment protocol we aim to obtain the primary rat RGCs." Deze zin is verwijderd.

In de appendix heb ik de volgende zin duidelijker gemaakt: "The purpose of the animal procedure described in this appendix is to provide suitable rat RGCs for the glaucoma disease modeling which aims to develop new glaucoma drugs."

Appendix 1

B. De Dieren

5. De 5.1 lid2h vraagt wat de rationale is achter het gebruik van rattenpups? Hoe relevant zijn de verkregen resultaten met cellen uit deze zeer jonge dieren voor de vertaling naar de mens?

Ad "zeer jonge dieren":

Wij gebruiken pups van rond postnatale dag 7. Op die dag zijn de axonen van de retinale ganglioncellen vanuit het netvlies al via de oogzenuw tot in de hersenen gegroeid, hebben ze daar al verbindingen gemaakt en zijn ze elektrisch actief. Deze cellen worden algemeen gebruikt voor onderzoek aan glaucoom.

Dit neemt niet weg dat het inderdaad jonge RGCs zijn terwijl veel vormen van glaucoom juist oudere mensen treffen. Het is in theorie mogelijk om RGCs van volwassen ratten te isoleren, maar de overleving van deze cellen lijkt heel beperkt, wat ze niet geschikt maakt voor onze in vitro glaucoom modellen, al zijn hier nauwelijks concrete data over gepubliceerd. Voor ons onderzoek is het relevant om de bevindingen van de RGCs van de jonge dieren te valideren voor volwassen dieren. Een van de mogelijkheden hiertoe, is na te gaan of de pathways en moleculaire targets die we in de jonge RGCs vinden ook aanwezig zijn de volwassen dieren. Daarom zullen we in WP4 ook checken of deze pathways en targets tot expressie komen in de volwassen dieren. Om dit duidelijker te maken hebben we de tekst in 3.4.1 bij kopje "WP4" aangepast: "The in vitro studies in WP2 will lead to the discovery of proteins and pathways that are involved in the cell death of RGCs. To verify that the discovered proteins and pathways are not only present in vitro, but also present in native RGCs in situ and to determine their exact localization and distribution in the eye, we will study their expression in eyes, collected for histology and biochemistry.

In our in vitro experiments we use RGCs from early postnatal rats, since this age gives an optimal yield of viable RGCs. In order to verify that the proteins and pathways discovered in these young animals are also relevant in the mature retina, we will also study their expression in eyes of adult. This will be done in parallel with the studies on developing neuroprotective strategies in WP3."

Ad "vertaling naar de mens":

Om te kijken of onze resultaten ook gelden voor de mens, volgen we 2 strategieën:

- (i) Op de korte termijn: We kijken in de literatuur of de gevonden pathways en moleculaire targets ook bij de mens voorkomen. We hebben een aantal human donorogen om ook zelf dit uit te zoeken indien nodig.
- (ii) Op de lange termijn: We werken aan het opzetten van differentiatie van humane RGCs uit iPSCs. Deze humane RGCs kunnen dan rechtstreeks in deze modellen getest worden.

6. De 5.1 lid2h merkt op dat u in WP4 ineens over gaat op volwassen ratten. Wat is hiervan de rationale?

Zie het antwoord op vraag 5 en de daarin genoemde aanpassing van de tekst van het PV.

D. Vervanging, vermindering, verfijning

7. De 5.1 lid2h verzoekt u nog duidelijker uiteen te zetten waarom cellijnen niet reeds geschikt zijn om alle pre-proefdierdoelen te behalen en of bijvoorbeeld de cultuur van primaire cellen uit proefdieren niet kan worden overgeslagen ten gunste van een meer fysiologisch preklinisch glaucoom model in proefdieren.

Dit lijken twee vragen. Vraag 1: Waarom zijn de cellijnen niet al geschikt?

Er is geen retinale ganglion cellijn. De tot voor kort veel gebruikte ratten RGC cellijn RGC-5, bleek na genetisch onderzoek een muizencellijn en ook niet van retinale ganglioncellen (Krishnamoorthy et al. 2013 *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54: 5712-9.). Er zijn uiteraard wel neuronale cellijnen en die gebruiken wij ook, maar er zijn veel verschillen tussen deze cellijnen onderling en met de primaire RGCs. De ratten RGCs zijn op dit moment nog de benchmark. Als voorbeeld zie het artikel van Kritis et al. over de verschillen tussen cellijnen bij onderzoek naar de effecten van de glaucoomtrigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, *Front. Cell. Neurosci.* 9:91) en een artikel over deze trigger in ratten RGCs (Ullian et al 2004, *Mol. Cell. Neurosci.* 26: 544-57). In de PV onder het kopje "Replacement" hebben we de tekst aangepast.

Vraag 2: waarom niet een meer fysiologisch preklinisch glaucoom model?

Hier zijn verschillende redenen voor. De belangrijkste reden is dat wij dit project zien als onderdeel van een groter project en als eerste stap in de richting van personalized medicine, waarin we cellen van de patiënt zelf bestuderen, hierin de gevoeligheid voor glaucoom triggers meten en de reactie op geneesmiddelen testen. Parallel aan dit project werken we met een analist, een PhD student en een postdoc aan het maken van humane retinale ganglioncellen voor deze toepassingen. Het is van belang om te beseffen dat glaucoom heterogeen is en dat er per patiënt nauwkeurig gekeken moet worden wat de optimale therapie is. Onze aanpak van een *in vitro* model met ratten RGCs kunt u zien als een voorbereiding op deze toekomstige "personalized" benadering, waarbij de retinale ganglioncellen van de individuele patiënt gebruikt zullen worden voor prognose en keuze van behandeling.

Daar komt bij dat in de praktijk een ideaal proefdiermodel voor glaucoom niet beschikbaar is. De genetische heterogeniteit van glaucoom maakt het ook moeilijk om met genetische modificaties een goed proefdiermodel te maken. Meest gangbaar zijn de experimentele glaucoommodellen, waarbij een oogdruk experimenteel verhoogd wordt. Deze zijn zeker van waarde maar wij kiezen ervoor om te investeren in het maken van *in vitro* glaucoom modellen die uiteindelijk ook gebruik kunnen worden voor RGCs van de patiënt zelf.

8. U geeft aan dat vers materiaal van gestandaardiseerde leeftijd en soort nodig is. De 5.1 lid2h vraagt hoe klinisch relevant deze uitspraak is? Komt glaucoom bij mensen ook voor in een homogene groep qua leeftijd? Verwacht u essentieel andere observaties bij een meer heterogene leeftijd? Hoe relateert u dat aan gebruik van ogen van rattenpups?

Voor onze in vitro modellen hebben we gezonde, levensvatbare retinale ganglioncellen nodig. We werken met zenuwcellen van het centrale zenuwstelsel, die we isoleren, kweken en aan celdood mechanismen blootstellen. Bij de isolatie worden axonen doorgesneden en de cellen mechanisch en met enzymen behandeld. De vitaliteit, kwaliteit en bruikbaarheid van deze cellen voor celdood modeling hangen sterk af van leeftijd en versheid van het materiaal (artikel Winzeler en Wang, eigen waarneming PV5.1 lid2h). Voor een kweek van ratten RGCs is de optimale leeftijd postnatale dag 7 (met een marge van enkele dagen). We hebben deze tekst in de appendix aangepast onder het kopje "Replacement".

II. Vragen met betrekking tot de strategie

3.1 Achtergrond

- 1. Het doel van dit project is helder. Echter, de noodzaak voor het gebruik van dieren is dat minder. Recent werk laat zien dat men RGCs kan verkrijgen vanuit iPSCs, zie bijvoorbeeld Ji & Tang (2019) en Rabesandratana et al. (2020), maar ook eerder werk bijvoorbeeld Gill et al. (2014), doi: <https://doi.org/10.1167/tvst.3.4.2> en Ohlemacher et al. (2016), <https://doi.org/10.1002/stem.2356>). De 5.1 lid2h vraagt zich af waarom een dergelijke opzet niet wordt gehanteerd? Zo bespaart men dieren en onderzoekt men de betreffende processen direct in humaan weefsel.**

Zoals hierboven vermeld is ons doel om uiteindelijk met humane retinale ganglioncellen te werken, meer in het bijzonder om de RGCs van de patiënten. We zetten de differentiatie van humane RGCs uit iPSCs op. We beschikken over een analist en een postdoc voor dit project en werken we ook met anderen (PhDs) hieraan. Net als andere laboratoria zoals u hierboven vermeldt, zijn wij nu in staat om uit iPSCs retinaal weefsel te laten differentiëren. In dit weefsel komen ook RGCs tot ontwikkeling getuige de expressie van eiwitten die kenmerkend zijn voor jonge retinale ganglion cellen. Markers van rijpe RGCs (zoals RBPMS) komen nog niet tot expressie. Ook is het nog niet mogelijk om uit dit weefsel de hRGCs te isoleren. De manier zoals we RGCs uit ratten retina's zuiveren, maakt gebruik van het oppervlakte eiwit Thy1. Dit is kennelijk nog niet op de humane RGCs tot expressie gebracht want de isolatie lukt niet. Het is duidelijk dat de rijpheid en de zuivering van hRGCs op dit moment nog veel te wensen overlaten. Ook in de literatuur is hier nog geen goede oplossing voor beschreven. Het is niet bekend hoelang het zal duren voordat de humane RGCs een rijpheid hebben zoals de ratten RGCs. Het is wel duidelijk dat op dit moment de ratten RGCs nog de benchmark vormen.

We hebben in de "Background" de volgende tekst toegevoegd: This PV is part of a larger research plan of our institute to enable personalized medicine for glaucoma patients. In order to achieve this we have established an eye tissue bank, in which patient biomaterial and clinical data of our patients are collected and stored. The biomaterial can provide patient iPSCs. We have started a research project (Postdoc, PhD and technician) to generate RGCs from these iPSCs. At this moment we are able to make retinal organoids in which RGCs develop as judged from staining with early RGC markers (e.g. ISLET1). Yet, they have not matured sufficiently (e.g. no staining with RBPMS). In addition, it is not possible yet to

isolate RGCs from these organoids. The protocols for isolation and purification of RGCs from the rat retina employ the surface protein Thy1. In the human organoid cultures apparently this protein has not been expressed sufficiently to enable its use for isolation and purification of human RGCs. At this moment, there is no good protocol available to generate mature and relatively pure hRGCs cultures. For now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

- 2. De 5.1 lid2h vraagt zich af of u(w) onderzoeksgroep niet eerst zou moeten aantonen dat de vereiste resultaten te verkrijgen zijn in een standaard PC12 cellijn wanneer de strategie is dat elk experiment met RGC uit rattenogen vooraf gegaan moet zijn door deze resultaten in PC12 cellen? Indien deze resultaten er al zijn vraagt de 5.1 lid2h deze op te nemen in het project.**

De PC12 cellijn (en andere, zoals SH-SY5Y) dienen er voor om het glaucoommodel en alle read outs operationeel te maken. Daar zijn we nu mee bezig en tussentijdse resultaten hebben we in het projectvoorstel opgenomen. B.v.: "In PC12 cells a significant increase in apoptosis (TUNEL-positive cells) was found after 24 hrs of 70 mmHg. Short exposure to 5% ethanol led to reversible damage in PC12 cells and SH-SY5Y cells."

- 3. De 5.1 lid2h vraagt zich af of voorgestelde neuroprotective geneesmiddelen of nutritionele interventies gericht zijn op preventie of op therapie?**

De nadruk ligt op preventie, maar enig functieherstel is niet uitgesloten. Geneesmiddelen of voedingsmiddelen die de RGCs wapenen tegen druk, oxidatieve stress e.d. kunnen als preventie gezien worden. Als een celdoodmechanisme al geactiveerd is in een RGC en er al functieverlies opgetreden is, dan kan mogelijk door gerichte toediening van blokkerende of herstellende medicatie zo'n cel weer tot een functioneel leven gewekt worden. Dan zou er sprake zijn van therapie, functie herstel, zij het op beperkte schaal. De mogelijkheid van (beperkt) functieherstel lijkt reëel. Het lijkt nu al voor te komen door b.v. oogdrukverlaging, al is dit nog onderwerp van debat. De mogelijkheid bestaat dat er een populatie beschadigde, tijdelijk inactieve RGCs is, die voor dit herstel kan zorgen.

- 4. U geeft aan dat er een tekort is aan menselijke ogen die postmortaal beschikbaar zijn voor onderzoek. De 5.1 lid2h vraagt welke zoektocht hieraan is voorafgegaan?** Uit het proefdieronderzoek blijkt dat voor ratten postnatale dag 7 de optimale leeftijd is. Een vergelijkbaar ontwikkelingsstadium voor de mens ligt voor de geboorte. Deze menselijke foetussen zijn niet beschikbaar voor onderzoek in Nederland vanwege praktische en ethische belemmeringen.

3.4 Onderzoeksstrategie

- 5. De 5.1 lid2h vraagt zich af of de eerste go/no-go niet na het PC12 werk moet zijn?**

Ja. Dit is ook zo. Dit staat vermeld als General GO / NO GO moments in de 3^e alinea van de research strategy. Dit geldt echter alleen als go/no go voor de technische haalbaarheid. We gebruiken PC12 cellen om de methodes op te zetten en aan te tonen dat alle procedures werken, zodat hier geen ratten voor gebruikt hoeven te worden.

- 6. PC12 is een rat pheochromocytoom (bijnier) cellijn met het potentieel om tot neuronen te differentiëren. De 5.1 lid2h vraagt zich af of er geen (knaagdier) cellijnen beschikbaar zijn, die sterker met retinale ganglionen verwant zijn.**

Er is geen retinale ganglion cellijn. Zie ook ons antwoord op vraag 7. Naast de PC12 cellijn, gebruiken we ook andere cellijnen, zoals de SH-SY5Y lijn.

- 7. De 5.1 lid2h vraagt of u(w onderzoeksgroep) een vergelijking tussen resultaten van de cellijn en de ratten RCG met betrekking tot celdoodmechanismen overweegt (dit met het oog op toekomstig gebruik van cellijnen in plaats van dierproeven)?**

Ja. We zullen hier in de publicaties zeker op ingaan.

- 8. Er zal steeds voorwerk verricht worden met PC12 (of vergelijkbare) cellen. Dat is voorstelbaar bij het testen van technieken, maar bij het valideren van een *target* – zoals wordt voorgesteld in WP3 – is dat niet vanzelfsprekend. Immers, de kans is aanwezig dat de gevonden *targets* niet of anders actief zijn in de cellijn. Als ze wel gelijkend actief zouden in de cellijn zijn, dan zouden de RGCs helemaal niet nodig zijn. De 5.1 lid2h vraagt dit punt te nuanceren danwel verder uit te leggen.**

We hebben dit niet precies genoeg geformuleerd. Het gaat ook hierbij weer om het testen en opzetten van de technieken. Als we apoptose met een caspase inhibitor willen tegengaan, dan kijken we eerst in een cellijn waarin apoptose optreedt hoe en wanneer we de caspase inhibitor kunnen toedienen, wat de positieve en negatieve controles zijn en hoe we kunnen meten en monitoren wat er in de cellen gebeurt. Als dit opgezet is, gaan we pas experimenten uitvoeren met ratten RGCs, waarbij uiteraard verschillen met de cellijn aan het licht kunnen komen. Door eerst de proef met de cellijn goed voor te bereiden, verwachten we uiteindelijk minder ratten nodig te hebben.

Ik heb de tekst iets aangepast: "The experiments will first be set up with PC12 cells. Once successful in PC12 cells, we will perform these experiments with primary rodent RGCs."

Is veranderd in: "The experiments will first be set up with an appropriate neuronal cell line. Once the procedure and all techniques to measure the effect of the drug have been set up in this neuronal cell line, we will perform these experiments with primary rodent RGCs."

- 9. De 5.1 lid2h begrijpt dat u bij middelen die de mitochondriële functie versterken het mitochondrieel glaucoommodel (en de andere modellen) gaat gebruiken. Hoe relevant is het gebruik van die andere modellen hier?**

Het korte, eenvoudige antwoord is dat dit niet relevant is en dat middelen die mitochondriën versterken niet getest zullen worden in andere modellen dan het mitochondriële model. Zo hebben we het in dit project bedoeld en ik heb derhalve ook de toevoeging "and in other models" geschrapt voor de geneesmiddelen die de mitochondriën versterken.

Hierbij kan wel aangetekend worden dat de werkelijkheid ingewikkelder is. De verschillende risicofactoren vertonen interactie. Bijvoorbeeld kan een hoge (oog)druk het transport van mitochondriën belemmeren. Het is niet mogelijk om al deze dingen te voorspellen. We hebben ons in dit project beperkt tot het onderzoek van 2 drugs per glaucoommodel. Als er meer interessante opties ontstaan, zullen we een amendement voorstellen of een nieuw PV ontwerpen.

10. Het is de 5.1 lid2h niet geheel duidelijk wat het doel van WP4 is. De kop zegt "Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3" maar uit de tekst eronder wordt niet duidelijk hoe resultaten van WP3 relevant zouden kunnen zijn voor WP4. Er wordt ook gezegd dat WP3 en WP4 parallel zullen lopen. De afwezigheid van een go/no go moment tussen WP3 en WP4 is zinnig als WP4 afhangt van WP2, maar niet van WP3. Anders is een go/no go moment wel zinnig.

U heeft gelijk. Molecular targets worden alleen in WP2 geïdentificeerd. Ik heb de woorden "and 3" geschrapt in de tekst.

Appendix 1

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

11. De go/no go criteria zijn zeer globaal beschreven. De 5.1 lid2h vraagt de relevante readouts voor de go/no go criteria beter te beschrijven en concretiseren. Met andere woorden: waar ligt de grens tussen go en no go?

We hebben een flow chart toegevoegd in de project proposal form om de go/no go criteria duidelijker te maken.

B. De Dieren

12. De 5.1 lid2h begrijpt dat u(w onderzoeksgroep) Sprague-Dawley ratten gaat gebruiken. Is dit de meest optimale keuze? Verwacht u verschillen tussen verschillende stammen ratten?

Dit is een, voor dit type onderzoek veel gebruikte rat en wordt ook in het lab gebruikt waar de methode ontwikkeld is en waar wij deze geleerd hebben (Barres Lab, Stanford). De resultaten verkregen met deze stam zullen goed vergeleken kunnen worden met resultaten van andere laboratoria. Het gebruik van deze stam heeft ook praktische/logistieke voordelen: De fok is aan 5.1 lid2h en de nesten zijn groot.

13. De berekening voor het aantal cellen dat geogst kan worden is gebaseerd op isolatie uit ogen van pups >4d oud. De 5.1 lid2h vraagt zich af of het dan niet beter zou zijn om alleen pups van 4-10 dagen te gebruiken?

Ja, op basis van de literatuur en onze resultaten in het nog lopende project zullen we pups gebruiken van 4-10 dagen voor de RGC isolatie. Ik heb dit in de tekst ook nauwkeuriger aangeduid. Alleen in WP4 zullen we ook dieren van een andere leeftijd gebruiken n.l. volwassen dieren.

D. Vervanging, vermindering, verfijning

14. Aansluitend bij vraag 1, vraagt de 5.1 lid2h verder op te helderen waarom iPSCs niet gebruikt kunnen worden voor dit onderzoek.

Zoals ook hierboven aangegeven (ons antwoord bij 3.1 Achtergrond), gelden hiervoor de volgende redenen:

- (i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.

- (ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.
- (iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoomodellen.

15. Er bestaan ook commerciële bronnen voor RGC (bv. Lonza, cat nr.: R-RET-508). De 5.1 lid2h vraagt waarom die niet (eerder) gebruikt kunnen worden?

Bij mijn weten zijn er geen cellijnen voor ons celtype. De Lonza cat nr: R-RET-508 cellen zijn volgens mijn navraag geen gezuiverde retinale ganglion cellen: "Our R-RET-508 Rat Neonatal Retinal Cells are isolated from the retina; comprised of the seven cell types normally found in retina (ganglion cells, amacrine cells, bipolar cells, horizontal cells, Muller cells, rods, cones). They are prepared by dissection/dissociation without purification."

16. De 5.1 lid2h vraagt zich af of in context van het eerst valideren van vraagstellingen in PC12 het niet aangeraden is om in parallel organoid modellen op te zetten voor hRGCs of zelfs rRGCs – bijvoorbeeld vanuit de vorige projectvergunningaanvraag, waardoor de noodzaak voor RGC isolatie komt te vervallen?

Dit zijn twee vragen:

1. Is het aangeraden om in parallel een organoid kweek op te zetten voor hRGCs? Ja. dit doen we. Dit project is 3 jaar geleden gestart, we investeren hier flink in en we verwachten dat dit de noodzaak om ratten RGCs te isoleren in de nabije toekomst zal wegnemen.
2. Organoid kweek voor ratten RGCs? Hier hebben we geen plannen voor. Het lijkt geen voordeel te hebben boven werken met humane RGCs. Glaucoom is een complexe multifactoriële aandoening waarbij veel genen betrokken zijn. Deze complexe genetische achtergrond kan het beste bestudeerd worden in cellen van patiënten (en controles). Zodra de differentiatie vanuit iPSCs en de isolatie van RGCs goed lukken zullen we dit met humane cellen doen.

17. U geeft aan dat er een tekort is aan vers postmortaal oogweefsel. De 5.1 lid2h vraagt hoe dit onderzocht is en welke opties hebt overwogen zijn door u(w onderzoeksgroep)?

Deze vraag is hierboven beantwoord bij vraag 8.

18. De 5.1 lid2h vraagt zich af of de ouderparen van WP1-3 niet in WP4 gebruikt kunnen worden?

Ja, dat kan. Ik heb de volgende zin toegevoegd aan "Reduction": "For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used."

H. Pijn en pijnbestrijding

19. De 5.1 lid2h vraagt welk soort anesthesie gebruikt wordt voor volwassen dieren? Kan dit een effect hebben op retinale cellen?

We gebruiken isofluraan anesthesie voor de volwassen ratten en zodra de dieren verdoofd zijn worden ze met decapitatie gedood. Op deze snelle manier kan een eventueel effect op de retinale cellen vermeden of geminimaliseerd worden. Dit is toegevoegd bij H.

20. Onder D wordt vermeld dat volwassen dieren algehele anesthesie zullen ondergaan (voordat ze gedood zullen worden). Het lijkt de 5.1 lid2h dan dat het antwoord onder H dan 'Yes' zal moeten zijn (non-recovery).

We hebben dit aangepast.

21. Indien decapitatie bedoeld (gebruikt) wordt: voor knaagdieren is dit volgens tabel IV van de EU-richtlijn wel toegestaan, maar er is wel een valide onderbouwing vereist (onder L). Indien gewenst kunt u voor verdere toelichting hierover contact met de IvD opnemen.

De tekst bij L is aangepast.

III. Methodische vragen

Appendix 1

B. De Dieren

1. De 5.1 lid2h vraagt of 80.000 cellen voor RNA-analyse niet heel erg veel is? Is hier geen reductie van benodigd aantal dieren mogelijk?

Ja. We denken inderdaad dat 60000 cellen voldoende zal zijn.

Uitleg: Bij commerciële bedrijven die RNA seq aanbieden wordt voor een standaard RNAseq experiment 2 microgr total RNA of een miljoen cellen aanbevolen. B.v.

[https://cdn2.hubspot.net/hubfs/3478602/Campaigns/EU/EU%20NGS/EU%20RNA-Seq%20GENEWIZ RNA-Seq Technical Specifications EU.pdf](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/3478602/Campaigns/EU/EU%20NGS/EU%20RNA-Seq%20GENEWIZ%20RNA-Seq%20Technical%20Specifications%20EU.pdf)

Eigen data laten zien dat we 1 microgr RNA uit 20.000 PC12 cellen kunnen isoleren. Dit zou betekenen dat 40000 cellen voldoende zijn voor 2 microgram RNA. Het is echter zo dat bij een kweek van primaire RGCs altijd celverlies optreedt voordat het experiment wordt ingezet en er kan ook celverlies optreden tijdens blootstelling aan de glaucoma trigger in het glaucoom *in vitro* model. Dit meewegende verwacht ik dat max 60000 cellen voldoende zullen zijn om deze experimenten goed uit te voeren. We hebben de tekst en de berekeningen aangepast.

2. De 5.1 lid2h vraagt waarom er bij WP3 drie triggers meegenomen worden in plaats van één trigger die geselecteerd is op basis van WP1? Op die laatste manier zijn $3 \times 1 \times 1 \times 3 \times 7 = 63$ coverslips van 20.000 cellen nodig, wat overeen komt met 32 pups. In totaal zijn dit dan $8 \times 32 = 256$ pups. Op die manier worden meer dan 500 pups bespaard (vermindering).

Glaucoom is een multifactoriële aandoening. Het eindstation van de pathologie is het verlies van de retinale ganglion cel, maar er kunnen veel verschillende sporen naar dit eindstation leiden.

Als patiënten verschillen in moleculaire pathways en mechanisme, dan is het aannemelijk dat zij ook verschillende geneesmiddelen nodig hebben. Een voorbeeld is dat er een groep glaucoom patiënten is die geen verhoogde oogdruk hebben. Bij deze patiënten speelt mechanische stress waarschijnlijk een minder prominente rol. In onze proefopzet is gekozen voor meerdere glaucoommodellen. In de praktijk hebben we een PhD die de invloed van mechanische stress onderzoekt, een PhD die mitochondriële dysfunctie onderzoekt en een PhD die het celdoodmechanismen en de omkeerbaarheid daarvan als onderzoeksthema heeft. We hopen dat elk project een eigen therapie optie (kandidaatdrug) kan ontwikkelen, voor een grotere of kleinere subgroep glaucoompatiënten.

3. De 5.1 lid2h vraagt zich af of 0 mmHg voor 8hr ofwel 24hr niet hetzelfde is en er hierdoor maar 5 experimentele groepen nodig zijn per model?

Nee. We zullen een base line meting moeten hebben van cellen die even lang in kweek zijn als de experimentele (druk-) condities. Dit is nodig omdat gedurende de kweek, de conditie en het aantal cellen achteruitgaan.

4. De 5.1 lid2h vraagt zich af of in WP3 twee condities van de trigger (e.g. 0 en 70 mmHg) niet voldoende zijn, aangezien WP1 zal aantonen wat grootste effect is, wat vervolgens in WP3 getest zal worden in therapeutische setting?

Kort antwoord: De blootstelling aan 70 mmHg is een model voor acuut hoge druk glaucoom, zoals kan optreden bij nauwe kamerhoek glaucoom. Daarentegen is blootstelling aan 30-35 mmHg een model voor chronisch glaucoom, relevant voor primair open kamerhoek glaucoom. Hierbij zullen de cellen niet meteen doodgaan, maar wel onder stress komen.

Nadere uitleg: Glaucoom is een verzamelnaam voor verschillende aandoeningen waarbij de oogzenuw beschadigt. Een hoge oogdruk is een belangrijke risicofactor. Bij sommige glaucoompatiënten kan de oogdruk in korte tijd heel hoog oplopen (acuut glaucoom). Ons *in vitro* glaucoom model kan deze situatie hopelijk goed nabootsen met een druk van 70 mmHg, een druk die bij acuut glaucoom inderdaad kan voorkomen. De kortdurende blootstelling aan 70 mmHg is zodoende een model voor acuut hoge druk glaucoom en met dit model onderzoeken we de acute, fatale effecten van zeer hoge druk op retinale ganglion cellen.

Primair open kamerhoek glaucoom is een andere vorm van glaucoom en komt het meest voor. Hierbij is ook vaak sprake van verhoogde druk, maar loopt de druk maar langzaam op en bereikt ook niet zulke hoge waarden. Het gaat hier om een mildere, maar wel lang aanhoudende, chronische mechanische stress. De cellen sterven niet meteen en masse af, maar heel geleidelijk, een voor een, over jaren. Bij deze chronische stress zullen de cellen zich aanpassen, wellicht minder goed functioneren, hun functie verliezen. Voor dit type glaucoom willen we met een lagere druk werken en onderzoeken hoe de RGCs hierop reageren. Als we de cellen blootstellen aan 30 a 35 mm Hg zien we wel effecten op de cel, maar deze zijn niet meteen lethaal (zo blijkt uit ons vooronderzoek met PC12 cellen). In de praktijk, zullen we deze effecten met morfologische readouts en gen expressie oppikken. In WP3 zullen we dan kijken of medicatie deze stress in de cellen kan voorkomen of pareren, bijvoorbeeld d.m.v. een betere functie van mitochondriën?



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 neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

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	5.1 lid2h
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3	
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1	
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2	
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel 5.1 lid2e Voorletters Achternaam <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2e
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel Voorletters Achternaam <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde	
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer	
		Postcode en plaats	
		Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	5.1 lid2e
		Afdeling	5.1 lid2h

	Telefoonnummer	5.1 lid2e
	E-mailadres	5.1 lid2e
1.5	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.6	(Indien van toepassing) Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	(Titel) Naam en voorletters <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.7	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	Telefoonnummer 5.1 lid2h
	E-mailadres	5.1 lid2h
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>
		<input checked="" type="checkbox"/> Nee

2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 01 - 03 - 2021
		Einddatum (t/m) 01 - 03 - 2026
3.2	Wat is de titel van het project?	Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Het nabootsen van glaucoom in celweek voor onderzoek naar geneswijzen die glaucoom tegengaan
3.4	Naam DEC	5.1 lid2h
	Postadres	

Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?

E-mailadres	5.1 lid2h
-------------	-----------

4 Factuurgegevens

4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam:	Afdeling:	
Straat:		Huisnummer:
Postcode:	Plaats:	
Postbus:	Postcode:	Plaats:
E-mail:		

4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer:

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel Aantal bijlage(n) dierproeven 1

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 en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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	5.1 lid2e
Functie	5.1 lid2e
Plaats	5.1 lid2h
Datum	14 - 01 - 2021
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.

The eye disease glaucoma is a leading cause of blindness with an estimated 70 million people affected worldwide, of which 7 million are bilaterally blind (*Weinreb et al. 2014, JAMA 311: 1901-1911*). The pathology is characterized by degeneration of the optic nerve, which disrupts transmission of visual information from the eye to the brain. The etiology is complex, involves multiple tissues and is currently

not completely understood. Important risk factors are age, ethnicity, and elevated intra ocular pressure (IOP). Also, mutations and sequence variants in over 150 genes have been found to be associated with disease risk (*Hubens et al. 2019, Curr Eye Res 44:1006-1017*). For the majority of these genes their role in glaucoma has not been clarified yet. The large number of genes involved suggests that glaucoma is a heterogeneous disease.

All current treatment modalities aim at lowering IOP. First, this will be tried by using medication (eye drops). If this is not effective, no longer effective or not well tolerated, surgery can be applied to increase drainage of aqueous humor and to achieve IOP reduction. Surgery, however, is also not successful in all patients, mainly because of fibrosis during wound healing, which may obstruct drainage of aqueous humor. In addition, it is important to note that even if IOP is successfully reduced, still the progression of the disease often continues. A possible reason for this is that the damage caused by high IOP will elicit a noxious, immune reaction which continues even after the IOP has returned to normal values. Taken together, current state-of-the-art treatments cannot prevent that one of every ten patients is blind at the end of their life, also in the Netherlands.

It is clear then that new treatment options are needed. The optic nerve is composed of the axons of retinal ganglion cells (RGCs) and the loss of these cells represents the irreversible step in the disease process. At 5.1 lid2h we started a research project focussed on these RGCs. We aim to find ways, e.g. drugs or dietary supplements, to prevent their death in glaucoma, preventing vision loss and blindness.

Our research strategy consists of mimicking glaucoma in the laboratory by culturing RGCs and expose them to cell death triggers and risk factors of glaucoma. We will use these *in vitro* glaucoma models to study the cell death mechanism pertinent to this risk factor or cell death trigger, and to develop and test neuroprotective drugs or dietary supplements for this cell death mechanism.

Several labs use this approach to study RGC cell death and to develop potential neuroprotective glaucoma drugs. For example, Welsbie et al. using primary rodent RGCs identified dual leucine zipper kinase (DLK) as a key neuroprotective target in RGCs and showed that tozasertib, a small molecule protein kinase inhibitor, protects RGCs from cell death in rodent glaucoma models (*Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50*). Sappington et al. isolated and cultured primary rat RGCs and exposed these cells to pressure, aiming to mimic the effects of elevated IOP. They identified mechanisms of pathology, therapeutic targets and protective agents, including interleukin 6 and Pigment epithelium derived factor (*Sappington et al. 2006, Invest Ophthalmol Vis Sci: 7: 2932-42*).

The current project proposal builds on our previous research including PV 5.1 lid2h. The overall aim of this project proposal was to investigate the molecular pathophysiology of glaucoma in view of developing new drugs. The strategy to achieve this was to set up primary cultures of retinal ganglion cells (RGCs) and to set up *in vitro* models for glaucoma.

In PV 5.1 lid2h we did the following experiments:

1. Make the protocol for isolation and purification of rat RGCs operational. We paid a working visit to the lab (Stanford), where this, commonly used, method was developed. We then set up this method in our lab in 5.1 lid2h.
2. We have tested and compared a number of variants of this method. A purification step with magnetic beads containing anti-Thy1 antibodies turned out to be an improvement over the original protocol.
3. To obtain the pups, we first had pregnant rats from the Brown Norway strain transported to 5.1 lid2h. This was not ideal. Sometimes, few or no pups were born. This rat strain is known for small nests. When a breeding of Sprague-Dawley rats was set up in 5.1 lid2h we decided to switch to this strain. This improved the supply and this strain has additional advantages that the nests are large and the strain is widely used and results can be readily compared with the results of other labs.
4. We have set up a number of *in vitro* models for glaucoma with PC12 cells, such as a model in which pressure is increased, to simulate the effect of high eye pressure. In PC12 cells a significant increase in apoptosis (TUNEL-positive cells) was found after 24 hrs of 70 mmHg. Next, we used rat RGCs in this pressure model. The cells were grown on slides that are coated (PDL and laminin) in order to enable a good adhesion of the cells. It turned out that the coating of the slides which we optimized for the PC12 cells is in practice unsuitable for the RGCs, which do not adhere properly. Subsequently, we tested and compared different coatings for PC12 cells and for RGCs for use in experiments with mechanical stress (publication in preparation).

5. Experiments on the influence of pressure on RGCs are currently taking place but have not yet been completed, partly due to Covid-19 limitations. Hopefully, this work can still be completed within 5.1 lid2h (until July 1, 2021).

As indicated above, glaucoma probably is a very heterogeneous disease. The heterogeneous character of this pathology, involving several molecular pathways, probably implies that there is not one drug that can prevent RGC death in all glaucoma patients. Instead, every different molecular pathway may require its own intervention and medication. For example, while elevated IOP is the main risk factor of glaucoma, there are also glaucoma patients that never experience elevated IOP. Other factors are known to be risk factors or physiological triggers of glaucoma. Important ones are deprivation of neurotrophic factors, glutamate excitotoxicity and mitochondrial dysfunction. Each trigger may activate a different signalling pathway leading to a cell death program.

The aim of this PV is to extend and expand the research started in the previous, still ongoing PV. We will extend the studies on the mechanical glaucoma risk factor and expand with research on other physiological triggers of glaucoma, i.e. neurotrophic factor deprivation and mitochondrial dysfunction. These experiments aim to mimic these factors *in vitro* and to study mechanism and possible treatment. For example, if we can show that mitochondrial dysfunction plays a role in glaucoma and model this *in vitro*, we can test the neuroprotective effect of drugs or dietary supplements that bolster mitochondrial function (as was recently suggested for vitamin B3 by Williams et al. (2017, *Science* 355: 756-60).

Apart from studying the mechanism and signalling cascades of specific glaucoma risk factors, we will also study the cell death program itself. Apoptosis probably is the most important cell death mechanism of RGC death in glaucoma (Quigley, 1995, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36: 774-86). Various triggers can lead to apoptotic cell death of RGCs. Once activated, apoptosis is generally considered to be irreversible, especially in late stages when cell death-executing activities occur. However, recent studies reveal that recovery of dying cells is possible, even after reaching critical cell death events (e.g. Tang and Tang 2018, *R. Soc. Open Sci.* 5: 180442). This phenomenon is termed anastasis. Promoting anastasis may represent a previously unrecognized mechanism of preserving differentiated cells that are difficult to replace, such as RGCs.

To start answering the question whether cell death of neuronal cells can be reversed, we have performed experiments on cells of the neuronal PC12 cell line with live cell imaging of the known key events in this cell death program, such as Annexin A5 membrane binding (Phosphatidyl-Serine exposition), loss of membrane integrity, mitochondrial membrane potential and cytochrome C leakage, caspase-activation, and nuclear morphology. We have done this by high-end optical microscopy and will soon combine this with transmission electron microscopy. Apoptosis was induced by two well-known pharmacological inducers of cell death, staurosporine and ethanol. Exposure to 5% ethanol led to reversible damage in PC12 cells and SH-SY5Y cells. The experiments will show whether and up till which stage apoptosis in neuronal cells can be reversed, preventing the cell death. This will be investigated by removing the cell death trigger, and by blocking cell death pathways (e.g. adding caspase inhibitors). When successful in PC12 cells, we intend to repeat these experiments with primary rodent RGCs to show that this approach actually can save RGCs and become relevant for glaucoma.

A general aspect of our strategy is that required methods and techniques will first be set up with a neuronal cell line (e.g. PC12). Cell lines of immortalized neuronal cells have advantages, ethically (no animals required) and practically (cells are readily available). Yet, they differ from the postmitotic RGC that degenerate in glaucoma and there may well be differences in cell death mechanisms and susceptibility between the neuronal cell line and RGCs. Therefore, when all methods have been set up and optimised using the neuronal cell line, we will perform the experiments with primary RGCs isolated from rats to make sure that our studies are relevant for glaucoma.

The aims of the research project are:

1. Clarify the mechanism of cell death of RGCs in glaucoma
2. Develop new treatments, such as neuroprotective drugs or diets that prevent RGC death.

Our research is both "basic research" and "translational research" as we focus on finding and testing neuroprotective drugs and therapies that can be further developed for clinical trials and for use in the clinic to treat glaucoma.

The animal experiments will provide the primary RGCs cells for three PhD projects. One will focus on the effects of pressure on RGCs (mimicking the effects of high IOP); the second will focus on the role of

mitochondria and the third will study the cell death programs in RGCs and the reversibility of these once started.

This PV is part of a larger research plan of our institute to enable personalized medicine for glaucoma patients. In order to achieve this we have established an eye tissue bank, in which patient biomaterial and clinical data of our patients are collected and stored. The biomaterial can provide patient iPSCs. We have started a research project (Postdoc, PhD and technician) to generate RGCs from these iPSCs. At this moment we are able to make retinal organoids in which RGCs develop as judged from staining with early RGC markers (e.g. ISLET1). Yet, they have not matured sufficiently (e.g. no staining with RBPMS). In addition, it is not possible yet to isolate RGCs from these organoids. The protocols for isolation and purification of RGCs from the rat retina employ the surface protein Thy1. In the human organoid cultures apparently this protein has not been expressed sufficiently to enable its use for isolation and purification of human RGCs. At this moment, there is no good protocol available to generate mature and relatively pure hRGCs cultures. For now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

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?

General aim of the research program is to develop treatments (e.g. drugs, dietary supplements) that prevent loss of RGCs in glaucoma.

Currently, no neuroprotective drugs are clinically available to treat glaucoma. In the present project, we set up *in vitro* models with rodent RGCs using several glaucoma triggers. These models will be used to study the mechanism(s) of glaucoma pathology in these cells. In addition, these models can be used to develop and test possible treatments and drugs.

This objective is achievable because rodent RGCs can be isolated, cultured *in vitro* and exposed to cell death triggers, thus modelling glaucoma. This has been done in other labs, e.g. by mimicking the effects of high IOP *in vitro*, and these techniques are now also operational in our lab.

The mechanism of RGC death can be studied with well-known techniques, such as gene expression profiling and live cell microscopic imaging. These techniques are operational in our laboratory and within our professional network.

In the *in vitro* glaucoma models, neuroprotective agents can be developed and tested. Rodent RGCs are often used with this purpose (e.g. *Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50*). If these agents (drugs, dietary supplements) are effective in the *in vitro* models, clinical trials can be initiated to bring the treatments to the patients.

More details on achievability are given below in "research strategy":

3.3 Relevance

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

1. This project will identify mechanisms of RGC death in a model of glaucoma. This is scientifically of interest for our understanding of glaucoma and for our understanding of survival of neurons in general. Since glaucoma is a multifactorial, heterogeneous disorder, we will study the effects of several glaucoma risk factors and triggers in order to be relevant for a wide range of glaucoma patients.
2. We will study whether the cell death program, once activated, can be stopped and reversed in RGCs (and neurons in general). This reversal of cell death, called anastasis, has been demonstrated for other cell types but not yet for neurons of the central nervous system.
3. We will develop new drugs / dietary supplements for protecting the RGCs (and the optic nerve) of glaucoma patients. In the Netherlands, estimates indicate that 162.500 people have glaucoma. Worldwide, glaucoma affects 70 million people and causes blindness of 7 million people. No cure is available. The only

treatment modality is to lower the IOP. Yet, this treatment often does not suffice. End-of-life blindness still amounts to 10% of patients, also in the Netherlands.

3.4 Research strategy

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

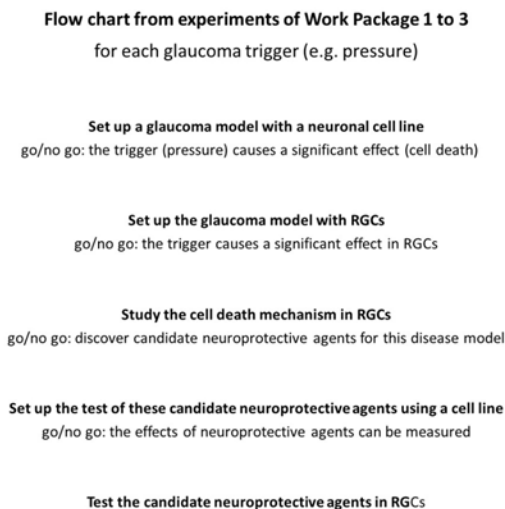
General aim of the research program is to develop new treatments to prevent the loss of RGCs in glaucoma. We will do this by mimicking the glaucomatous RGC cell death *in vitro*, study the disease mechanisms and develop and test neuroprotective treatments.

As glaucoma is a multifactorial and probably very heterogeneous disease, we will study 2 different physiological glaucoma triggers (high IOP and mitochondrial dysfunction) and 2 different well-known cell death triggers (e.g. ethanol, staurosporine) to study the possibility of prevention or reversal of the cell death program in RGCs.

The project is divided into 4 work packages:

1. Set up *in vitro* glaucoma models
2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)
3. Develop and test new neuroprotective treatments
4. Study the ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2

GO/NOGO moments: All individual research projects will first be set up using a neuronal cell line. This serves to solve practical issues and establish experimental protocols. Only when all practical issues are settled, we will use primary rodent RGCs. In addition, we have defined no/nogo criteria for progression from WP1 to WP3. This is illustrated in the following flow chart:



Work Package (WP) 1. Set up *in vitro* glaucoma models

This will be first done using cells of a neuronal cell line (e.g. PC12). As soon as the trigger produces consistently and reliably the desired effects on the cells of the neuronal cell line (e.g. cell death, structural and molecular changes) we will start using RGCs to establish this glaucoma model with RGCs.

More in detail:

To set up these models we need

- 1) cultured RGCs
- 2) glaucoma / cell death triggers

Isolation and purification of rodent RGCs have been made operational in our laboratory in the current PV
5.1 lid2h

The rat is most widely used for generating primary RGC cultures and modelling glaucoma (e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*). Therefore, we will use this animal.

Employing the neuronal cell line PC12 (i.e. without use of rodent RGCs), we have already set up several cell death models, using the glaucoma trigger mechanical stress (involved in high IOP, e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*) and cell death triggers such as ethanol and staurosporine (known cell death inducers to study anastasis). We are currently setting up a model of mitochondrial dysfunction, which also is a known glaucoma risk factor (*Williams et al. 2017 Science 356: 756-60*). We will set up these cell death models in our lab with PC12 cells. When they are fully operational, we will use rodent RGCs, exposing them to these cell death triggers, in order to create more realistic glaucoma models.

GO / NO GO: As soon as a trigger consistently causes relevant changes in the RGCs (e.g. cell death, structural and molecular changes) we will proceed to the next step with this model. For example, as soon as an exposure to pressure (e.g. 70 mmHg) causes significant increase of cell death in RGCs.

WP 2. *Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)*

We basically employ two techniques to study the cell death mechanism:

1. Cell biology: Live cell imaging and pharmacological intervention will be used to monitor in detail the sequence of events in the cell death process.
2. Molecular biology (gene expression). We will perform RNAseq to reveal the molecular events that occur during cell death.

Again, required techniques and *in vitro* models will first be set up and optimized with a neuronal cell line (e.g. PC12). Only when this has been achieved, we will use primary rat RGCs in these glaucoma models.

GO / NO GO: The outcome of this WP should be that we have candidate targets for neuroprotective drug development in these models. For example, targets in mitochondrial function, neurotrophic support of the cells, or in regulation of caspase activity.

WP 3: *Develop and test new neuroprotective treatments*

Using the information we obtain on RGC cell death in WP 2, we will design new therapies. For example, if caspase is involved in the cell death mechanism, RGCs may be rescued by caspase inhibitors. In addition, we can test whether drugs or dietary components that bolster mitochondrial function, rescue RGCs in the glaucoma model of mitochondrial dysfunction.

The experiments will first be set up with an appropriate neuronal cell line. Once the procedures and all techniques to measure the effect of the drug have been set up in this neuronal cell line, we will perform these experiments with primary rodent RGCs.

We aim to develop 2 candidate drugs for each trigger (i.e. pressure, mitochondrial dysfunction, ethanol and staurosporin).

WP 4: *Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2 and 3*

The *in vitro* studies in WP2 will lead to the discovery of proteins and pathways that are involved in the cell death of RGCs. To verify that the discovered proteins and pathways are not only present *in vitro*, but also present in native RGCs *in situ* and to determine their exact localization and distribution in the eye, we will study their expression in eyes, collected for histology and biochemistry.

In our *in vitro* experiments we use RGCs from early postnatal rats, since this age gives an optimal yield of viable RGCs. In order to verify that the proteins and pathways discovered in these young animals are also relevant in the mature retina, we will also study their expression in eyes of adult. This will be done in parallel with the studies on developing neuroprotective strategies in WP3.

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.

Throughout the project we will employ only one type of animal experiment: Euthanization of rats without prior experimentation. Most of these animals are pups before weaning, while a relatively small number of adult animals is used in WP4. We will take the eyes in order to isolate and culture the RGCs, that are

needed for the specific experiments to develop new glaucoma therapies. In a few sacrificed animals (WP 4) we will use the eyes to study protein/mRNA expression.

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 animal experiments provide the eyes for rodent RGCs needed for the experiments of all 4 work packages of the project. The overall research project currently involves three PhD projects each focusing on a different glaucoma trigger / mechanism: mechanical stress, mitochondrial dysfunction, and reversal of cell death / anastasis). The go-no goes are described in 3.4.1.

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	Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research
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'.

5.1 lid2h

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number

Type of animal procedure

1

Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

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 the current research project, we focus on retinal ganglion cells (RGCs) since the loss of these specific cells represents the irreversible step in glaucoma pathology. General aim of the research project is to develop new treatments to prevent the loss of RGCs in glaucoma. We will do this by mimicking the RGC cell death of glaucoma *in vitro*, study the disease mechanisms and then develop and test neuroprotective treatments.

In order to model RGC cell death *in vitro*, RGCs are required. In this project, we will employ primary cultures of rat RGCs. (for justification of this choice see below "D, Replacement"). The purpose of the animal procedure described in this appendix is to provide suitable rat RGCs for the glaucoma disease modeling which aims to develop new glaucoma drugs. The primary output parameter of the animal procedure will be the yield of suitable RGCs for the *in vitro* glaucoma models.

General design of the animal procedures:

The rats are euthanized, without prior experimentation. The eyes are taken out and further processed.

Isolation and purification of the RGCs occurs according to established protocols, that are operational in our laboratory. Next, the RGCs are used in experiments aimed at developing neuroprotective drugs and treatments.

In work packages 1- 3 early postnatal animals will be used since at this stage the yield of viable and well differentiated RGCs is optimal (Winzeler and Wang 2014, *Cold Spring Harb Protoc*; 2013; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961).

In work package 4, also adult animals are used in order to verify that the molecular targets identified in the current project are also present in the adult retina.

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

Early postnatal rat pups (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation.

Adult animals will be first anesthetized and then killed.

After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.

These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

The other organs may be removed and donated to other research projects.

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

As stated in the project proposal form, the animal experiments are needed for 4 different work packages:

1. Set up *in vitro* glaucoma models
2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)
3. Develop and test new neuroprotective treatments
4. Study the ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2

To minimize the number of animals required, we first use immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up and optimize all required techniques. Only if a method or technique is successfully set up using PC12 cells, will we continue with rat cells (GO / NO GO criterium).

GO / NO GO criteria: For each glaucoma model is progression from WP1 to WP2 only possible when WP1 is successfully completed. Similarly, only after completion of WP2, WP3 can be started. WP4 can be done in parallel with WP3 (also see flow chart in project proposal).

We will use statistical methods to demonstrate significant effects in our experiments. In the scientific literature of this type of experiments (pathology models using primary rodent RGCs cultures), generally parametric statistical tests (Student's T test, one- and two-sided ANOVA, $P < 0.05$) are used. The sample size is the number of biological replicates, i.e. the number of individual RGC isolations, each using a pool of biologically different retina's to isolate RGCs. Each biological replicate contains sufficient RGCs to allow technical replicates of the measurements in order to keep the standard deviation of the measurement low.

Examining the literature we found that the samples size for this kind of experiments generally is 3 to 7. In rare instances, higher samples sizes are used. Since we are interested in large effects, we are confident that a sample size of max 7 will be sufficient for our project.

A good illustration is a recent study in *J Mol Biol*, on lactate-mediated protection in retinal ganglion cells (Vohra et al 2019, *J. Mol Biol.* 143: 1878-1888). In this study, several different types of experiments were done each demonstrating significant effects, each using different samples sizes, ranging from 3 to 7. Therefore, a sample size of max 7 likely is sufficient for these type of experiments to obtain biologically meaningful results. In our experiments (see below) we will therefore, request sufficient rats to achieve a maximum sample size of 7. Yet, this maximum will not always be needed and we will start the experiments with a lower sample size and see whether this is sufficient to significantly demonstrate the biological effect.

We selected those analysis techniques that generate relatively much information from limited use of animals. These techniques are:

- 1) Live, single cell imaging, which requires less cells than many other, cell biology methods.

2) RNA sequencing to comprehensively analyse the molecular mechanisms of RGC cell death.

B. The animals

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

Species: rat, wild type

Choice for rats:

The rat is most widely used for generating primary RGC cultures (pioneering work of dr. Barres: *Barres et al. 1988, Neuron 1: 791-803*) and modelling glaucoma (e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*). Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

Origin:

We will obtain the animals from certified suppliers or from local breeding.

Life stage:

Early postnatal rats are used since this stage is optimal for providing cultures of viable, well-differentiated RGCs (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961*).

In addition, a limited number of adult animals is required (in work package 4) to determine the localization of expression of proteins, that are found in work package 2 to be important for RGC cell death.

Strategy for breeding and using pups:

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest. We aim to leave at least 2 pups with the mother. Our method of isolation of RGCs requires a minimum of 4 pups (8 retina's) for each isolation, which means that we would like to have at least 6 pups per litter. This generally will be the case (we use the strain Sprague Dawley which has average litter size of 10.5). In addition, we can use more than one breeding pair if we need many pups. Yet, there always is the possibility that there will be less than 6 pups born. If there are less than 4, we cannot and will not perform the experiment. If there are 4 or 5 pups born, we will choose to use the complete nest. This will lead to discomfort to the mother but otherwise would lead to 4 to 5 pups being killed without use. We expect that this situation (a single litter of 4-5 pups) will not happen often. For calculating the number of animals required we will assume it happens 1 out of 10 experiments.

In addition, we will try to re-use the mothers as much as possible.

Estimated numbers:

The number of animals required was estimated on the basis of our pilot studies and previous published studies in the literature using similar materials, methods and research questions. As indicated above, a maximum sample size of 7 apparently is sufficient for most of these experiments to obtain meaningful results.

Also relevant is the yield of RGCs per rat. Yields of RGCs according to the published protocols (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906*) are 30,000 cells for early postnatal rat retina. In our hands, the yield of RGCs were on average approximately 20000 viable RGCs per retina, which means 40000 RGCs per animal, for use in our experiments.

Calculation of the numbers of animals needed for the experiments:

The rat RGCs are needed for multiple, diverse studies. In the project proposal form we listed the following 4 work packages (WP):

WP 1. Set up in vitro glaucoma models

WP 2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

WP 3. Develop and test new neuroprotective treatments

WP 4. Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in WP 2

WP 1: Set up in vitro glaucoma models

Max 168 pups required

Calculation: We will set up glaucoma *in vitro* models with the following triggers: 1) mechanical stress, 2) mitochondrial dysfunction, 3) ethanol and 4) staurosporine. For each of these models, we will first set up all techniques using a neuronal cell line (e.g. PC12). After that, we will perform experiments with primary RGCs to explore the sensitivity of RGCs for the trigger and select the optimal conditions for the trigger.

To measure the effect of the cell death triggers, we examine cells seeded on coverslips. Each coverslip is seeded with 20000 cells. One coverslip is required for cell death assessment; a second coverslip is used for morphology. Multiple positions on the coverslip will be imaged in order to get a fair estimate of the effect of the trigger. For each glaucoma model, we aim to find the conditions of the experimental parameters that define max. 6 experimental groups, including the control. For example for mechanical stress, we expect to use hydrostatic pressure of 0, 35 and 70 mmHg, with two durations (e.g. 8 hrs and 24 hrs), which means 6 experimental groups. For each group two coverslips are needed for assessment: We need 12 coverslips for one independent experiment, performed with cells from one independent RGC isolation. We will use max seven experiments to set up and establish each disease model.

Calculation:

Each cell death trigger: max. 84 coverslips, each containing 20000 cells. Isolation of RGCs of rats of postnatal day 7 yields 40000 cells per rat. Per trigger 42 pups are required.

In total for 4 triggers: $4 \times 42 = \text{max. } 168$ pups

WP 2: Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

- WP 2A: Cell biology/live-imaging: max 42 pups

We will study the cell death process in each disease model in detail with live cell imaging using light microscopy and correlative electron microscopy. In these live imaging experiments, single cells are examined (various single cells at several positions in each experiment). Our pilot experiments with PC12 cells have shown that 10000 cells per slide are sufficient to obtain an adequate cell sampling for reliable measurement. In each imaging session, six conditions are imaged (control, plus five experimental conditions for assessing the cell death mechanism). This means that cells of 3 eyes are required for each imaging experiment. We will replicate each imaging experiment max 7 times with independent RGC isolations in order to document the involved cell death program. To study this in four disease models, we require in total 42 pups.

- WP 2B: Molecular biology / biochemistry: max 420 pups

Biochemical experiments (RNAseq) will be done for the cell death triggers (4) and various time points (max 2) and trigger strengths (max 3, including the control).

For RNAseq, 2 microgram of total RNA is recommended per sample by commercial sequencing companies (e.g. https://cdn2.hubspot.net/hubfs/3478602/Campaigns/EU/EU%20NGS/EU%20RNA-Seq%20/GENEWIZ_RNA-Seq_Technical_Specifications_EU.pdf). Own data show that we can isolate 2 micrograms out of 40000 PC12 cells. However, when using primary rat RGCs, there will be cell loss in the first days after isolation, before the experiment can start. Also the glaucoma trigger will induce cell loss. All together, we expect that if we seed maximally 60000 cells, we will have sufficient RNA for RNA seq. In parallel, for each sample we will measure the effects on cell death and morphology using 2 separate coverslips (20000 cells). Per sample we thus require in total 100000 cells (5 eyes) for one experimental condition. Per cell death model, we will use maximally 6 experimental conditions (i.e. max 3 trigger strengths and max 2 time points). To measure these 6 conditions, max 15 pups are required for sample size $N=1$.

We will use one way or two way ANOVA design to analyse the effects. We will use a sample size of max $N=7$, aiming to discover the major molecular mechanisms of each cell death model.

Per cell death trigger we thus need 7×15 is 105 pups.

For 4 cell death models we require max 420 pups.

WP 3: Develop and test new neuroprotective treatments.

Max 760 pups

To prevent or reverse cell death by the different glaucoma triggers, different drugs / dietary supplements will be tested for the different triggers (e.g. mechanical stress, apoptosis / anastasis). We will test max 2 candidate drug in each glaucoma model. These drugs will be tested using cell death, morphology and gene expression as potential output parameters.

One experiment to test one drug consists of 3 drug concentrations (i.e. two drug concentrations and the blank control), 3 conditions of the trigger (e.g. mechanical stress: 0, 35 and 70 mmHg), one time point (e.g. 24 hrs), 3 coverslips of 20000 cells to measure the output parameters (e.g. cell death measurements, morphology). This means 27 coverslips. We will use max 7 biological replicates with independent RGC isolations. In total, one experiment to test one drug in one glaucoma model would then require max 189 coverslips of 20000 cells, requiring 95 pups.

Testing 8 drugs (2 drugs per trigger) requires max 760 pups.

WP 4: Study native ocular expression and localization of molecular targets discovered in WP 2
Max 42 animals required: 21 pups and 21 adult rats.

In order to establish the native ocular expression and localization of glaucoma proteins we will employ the following methods: immunohistochemistry, in situ hybridisation, western blotting and mRNA analysis. In this experiment no statistical testing is needed. We expect to need a sample size of max. N=7 to obtain solid results.

For immunohistochemistry and in situ hybridisation combined, we will use max 7 pups and 7 adult rats to achieve a sample size of N=7. For western blotting we will use two eyes (one rat) for each biological replicate, requiring in total. max 7 pups and max 7 adult rats. In addition, for mRNA expression we will use max 7 pups and 7 adult rats.

In total, for this work package we request 21 pups and 21 adult animals.

Calculation of the total maximum number of animals required in this PV: 1518 rats

- Pups: max 1482

Explanation: Data of max 1411 pups are needed for WP 1, 2, 3 and 4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances we calculate 5% extra animals (71 pups): in total, max 1482 pups are requested.

- Mother rats with discomfort: 14

Explanation: An estimated 14 mother rats will experience discomfort because their full nest is taken away for use in experiments (if the nest contains 4-5 pups, see above). To calculate this number we assume that we will use Sprague Dawley rats for the experiments with an average nest size of 10.5 pups. For 1482 pups we need 141 nests. With an assumed frequency of one out of 10 nests that has 4-5 pups, we will then cause discomfort in 14 mother rats.

- Adult Rats: 22

Explanation: Max 21 adult rats are calculated for WP4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances, we calculate 5% extra animals: 1 extra animal.

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.

We intend to re - use the mothers for breeding. In a small percentage this may result in mild discomfort in case all offspring are used.

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:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments.

There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57). We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model.

The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age.

Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria.

In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (IPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human IPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Reduction:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped.

All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12).

We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful.

It is possible to combine the use of animals:

-Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.

- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).
- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.
- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").
- We will use the mothers more than one time if possible.
- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible.

We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Refinement:

Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently.

We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals.

The choice for our *in vitro* approach, implies that no *in vivo* glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used.

Application of bio-informatics for *in silico* analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test *in silico* potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments.

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".

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

We will apply general anaesthesia for adult animals.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n/a

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The rats are euthanized, without prior experimentation. We will anesthetize the adult animals first by isoflurane. Early postnatal animals will be euthanized without anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Since no treatment is imposed (other than the sacrifice of the animals), adverse effects on animals' welfare are not expected.

Stress may occur in the mothers when pups are taken away. To avoid this, we will try to use local breeding and re-use mothers. We expect that it will be often possible to use only a part of the litter for RGC isolation (see above). This reduces the stress for the mother and the remaining pups can be used for future breeding or other experiments.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

See above

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').

"Mild" : For 100% of the animals since they are euthanized for collection of eye tissue, or, in case of the mothers, if all pups are taken away.

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.

It is necessary to kill the animals in order to collect the eyes.
Euthanasia will be performed conform Annex IV of Directive 2010/63/EU.

Early postnatal rats (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation.

Adult animals will be first anesthetized and then killed by decapitation.

After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.

These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

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

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

Yes

Naam van het project	Het nabootsen van glaucoom in celkweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan
NTS-identificatiecode	NTS-NL-226154 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	glaucoom retinale ganglioncell celkweek oogzenuw blindheid
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren) Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van zintuigorganen (huid, ogen en oren) bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>De oogziekte glaucoom wordt gekenmerkt door schade aan de oogzenuw, hetgeen leidt tot vermindering van het gezichtsvermogen en blindheid. De ziekte komt veel voor en heeft grote impact. Wereldwijd lijden naar schatting 70 miljoen mensen aan deze ziekte waarvan er 7 miljoen blind zijn.</p> <p>Het is nog onduidelijk hoe de ziekte precies ontstaat. Bekende risicofactoren zijn leeftijd, aanleg, etnische achtergrond en een hoge druk in het oog. Op dit moment bestaat de behandeling uit het geven van oogdruppels en chirurgische ingrepen die tot doel hebben om de druk in het oog te verminderen. Helaas kan dit de ziekte vaak niet helemaal stoppen en blijft het gezichtsvermogen achteruitgaan: Aan het eind van het leven is 10% van de glaucoompatiënten blind aan beide ogen, ook in Nederland.</p> <p>Het huidige project zoekt nieuwe behandelmogelijkheden. De achteruitgang van het gezichtsvermogen is het directe gevolg van het afsterven van de gespecialiseerde zenuwcellen in het oog, die de lichtprikkel van het oog naar de hersenen geleiden. Deze zenuwcellen, de zogenaamde retinale ganglioncellen, kunnen niet vervangen worden als ze verloren gaan. Zo neemt met elke cel die verloren gaat, telkens het gezichtsvermogen een beetje af.</p> <p>Het doel van dit onderzoek is geneesmiddelen en/of voedingssupplementen te identificeren die deze cellen beter beschermen. Onze aanpak is als volgt: We isoleren deze gespecialiseerde cellen uit het netvlies van proefdieren, houden deze in het laboratorium in leven en stellen ze bloot aan factoren, waarvan we weten dat ze een rol spelen bij glaucoom. Zo bootsten we bijvoorbeeld de effecten van hoge oogdruk in het laboratorium na. In dit glaucoommodel onderzoeken we dan heel gedetailleerd hoe en waarom de cellen doodgaan en welke behandeling dit kan tegengaan. Het doel is om geneesmiddelen of voedingssupplementen te ontwikkelen die deze cellen en de oogzenuw beschermen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk	<p>Het project heeft de volgende verwachte opbrengsten:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Kennis van de moleculaire processen die bij glaucoom in de retinale ganglion cellen optreden en die leiden tot het afsterven van deze cellen. Dit is wetenschappelijk van belang. 2) Het identificeren van mogelijke geneesmiddelen of voedingssupplementen die deze cellen en de oogzenuw beschermen bij glaucoom. Het streven is hiermee het verlies aan gezichtsvermogen te

voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

vertragen en blindheid uit te stellen of te voorkomen. Dit is van groot maatschappelijk belang. In vervolgonderzoek kunnen de kandidaat-geneesmiddelen vervolgens in klinische trials worden getest.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren worden eerst eerst geëuthanaseerd zonder voorafgaande handelingen. Vervolgens worden de ogen gebruikt voor het verkrijgen van de gespecialiseerde oogcellen.</p>				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De dieren worden in het kader van het onderzoek gedood. Dit gebeurt door middel van euthanasie, uitgevoerd door gekwalificeerd personeel, waardoor pijn en stress minimaal zal zijn. Voorafgaand aan de euthanasie wordt geen ongerief verwacht omdat de dieren gefokt, gehuisvest en verzorgd worden door gekwalificeerd personeel onder gecontroleerde en goede omstandigheden. Alle noodzakelijke handelingen worden door gekwalificeerd personeel uitgevoerd.</p>				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>		
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>			
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden in het kader van het onderzoek gedood. Het doel van de proef is om gespecialiseerde netvliescellen te verkrijgen. Hiervoor is het noodzakelijk de dieren te euthanaseren en de ogen uit te nemen.</p>				
	<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>	
	<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>1518</p>	<p>0</p>	<p>1518</p>	<p>0</p>
	<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De onomkeerbare stap in glaucoom is de celdood van de retinale ganglion cellen. Daarom richt het project zich op deze gespecialiseerde netvliescellen. Deze gespecialiseerde cellen kunnen niet lang in het laboratorium in leven gehouden worden en kunnen zich niet vermeerderen. Ze moeten daarom regelmatig uit proefdieren geïsoleerd worden. Slachtafval voldoet niet als bron voor de cellen omdat het bronweefsel heel vers moet zijn en alle omstandigheden precies gestandaardiseerd moeten zijn om de kweek van deze kwetsbare cellen te doen slagen en de variatie beperkt te houden. Ook humane donorogen kunnen niet verkregen worden voor succesvolle isolatie en kweek van retinale ganglion cellen. Op dit moment is het nog niet mogelijk om goed gedifferentieerde humane retinale ganglion cellen te verkrijgen d.m.v. stamceltechnologie. Ook zijn er geen onsterfelijk gemaakte cellijnen beschikbaar voor deze gespecialiseerde netvliescellen. Daarom zullen we de uiteindelijke proeven moeten doen met retinale ganglion cellen verkregen uit proefdieren. Wel is het mogelijk om onsterfelijk gemaakte cellijnen te gebruiken om de proeven met de retinale ganglioncellen van ratten zo goed mogelijk voor te bereiden. Op deze manier zullen we het aantal gebruikte proefdieren zo laag mogelijk houden.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Statistische methoden worden gebruikt om het aantal proefdieren zo klein mogelijk te houden. Voor onze experimenten gebruiken we alleen de ogen. De andere weefsels kunnen door andere onderzoekers gebruikt worden. Omgekeerd, kunnen we ook oogweefsel gebruiken van andere dierexperimenten als het aan onze criteria voldoet. Daarnaast maken we gebruik van bio-informatica programmatuur om zo goed mogelijk te voorspellen welke geneesmiddelen voor ons doel het meest geschikt zijn om het aantal experimenten waarvoor proefdieren nodig zijn tot het minimum te beperken. In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen (zoals het sequencen van het mRNA) die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen (zoals het sequencen van het mRNA) die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren. Door te kiezen voor een in vitro benadering is geen in vivo glaucoomdiermodel met bijbehorend ongerief nodig. Het verzamelen van pups voor het spenen kan voor de moeders ongemak veroorzaken. We zullen proberen dit ongemak te minimaliseren door lokale kweek te gebruiken en niet het volledige nest te gebruiken, maar slechts een deel van het nest.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia

We kiezen voor de rat als proefdier om verschillende redenen. Dit proefdier is goed vergelijkbaar met de mens en retinale ganglion cellen van de rat kunnen goed model staan voor de humane

toe

netvliescellen. Er is een grote kans dat als een geneesmiddel in de cellen van dit proefdier werkt, dat het dan ook gebruikt kan worden om een therapie voor de mens te ontwikkelen. Bovendien zijn veel kennis, expertise en ook technische hulpmiddelen beschikbaar voor deze diersoort. We zullen jonge, nog ongespeende ratten gebruiken omdat deze leeftijd het beste is om een goede opbrengst aan netvliescellen voor de celweek te verkrijgen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

Datum 07 mei 2021
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114405

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
 Aanvraagnummer: AVD202114405
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<p>Proces</p>	<p>De volgende vragen zijn gesteld:</p> <p>5.2 lid1</p> <p>- Het is voor ons niet duidelijk of u mannelijke/vrouwelijke of beide geslachten van pups gebruikt in uw proef. Ook van de volwassen dieren is niet duidelijk welk geslacht dit betreft. Kunt u een toelichting geven over het geslachten van de proefdieren?</p> <p>5.2 lid1</p> <p>5.2 lid1</p> <p>Vragen over de NTS: - De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld moleculaire processen, gedifferentieerde en euthanaseren) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.</p>
----------------------	---



[Redacted text]

Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD.pdf

Pagina: 1

-
-  Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 10-5-2021 17:03:19
5.2 lid1 in de bijlage dierproeven staat bij deel B, de dieren, origin: We will obtain the animals from certified suppliers or from local breeding. Zijn gefokt voor onderzoek
-
-  Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:09:40
-
-  Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:13:47
5.2 lid1 Bij de volwassen dieren mist wel de onderbouwing. Omdat je dan toch over de geslachten gaat vragen zou ik hem gewoon breed trekken en vragen: Kunt u onderbouwen of u beide geslachten pups en volwassen dieren in uw onderzoek gebruikt? Kunt u deze informatie ook aanvullen in de bijlage dierproeven?
-
-  Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:21:46
5.2 lid1
-
-  Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:14:00
-
-  Nummer: 6 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 18:00:59
5.2 lid1 heeft de foster moeders in de bijlage opgeteld bij de aantallen dieren. Deze dieren zijn echter niet vergunningplichtig. Kunt u deze 14 dieren weghalen en de aantallen in de bijlage kloppend maken? Kunt u zorgen dat de aantallen in de NTS consistent zijn met de aantallen in de projectaanvraag?
-
-  Nummer: 7 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:22:09
-
-  Nummer: 8 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:26:33
U spreekt in de NTS bij what procedures are typically used, en de expected harms over het euthanaseren van de dieren. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden?

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sprague Dawley	2.518	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Er worden voornamelijk jonge ratten (postnatal dag 4 - 10) gebruikt en een beperkt aantal volwassen dieren.

Er is voor deze diersoort gekozen, omdat Citaat:

Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

De pups worden gedood door middel van decapitatie.

De herkomst van de volwassen dieren is onbekend.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies

Citaat C10.

De dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de standaard richtlijnen in de Directive 2010/63/EU. De 5.1 lid2h heeft zich hiervan verzekerd op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de IvD als de aanvrager (zie punt F in de bijlage).

Citaat C11.

De 5.1 lid2h acht het ongerief, mild ongerief bij 100% realistisch ingeschat, zoals nader gepreciseerd in bijlage 1 sectie K. Waar in de 5.1 lid2h discussie over was is de inclusie van 14 moederdieren die (mild) ongerief zouden ondervinden door het wegnemen van alle pups vóór speenleeftijd. Naar beste weten van de DEC-leden valt dit onder fok, en fok is geen dierproef.

Citaat C14.

Dit punt is uitgebreid besproken en de onderzoekers zijn hierop ook nog bevraagd. In hun antwoord konden zij goed onderbouwen dat er op dit moment nog geen bruikbaar alternatief is waarmee de doelstellingen van de proef behaald kunnen worden. Geschikte cellijnen (of stamcellen)

Pagina: 2

Nummer: 1 Auteur: [5.1 lid2e](#) Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:28:59
Zonder de 14 moederdieren, dus 1504

Nummer: 2 Auteur: [5.1 lid2e](#) Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:28:25

Nummer: 3 Auteur: [5.1 lid2e](#) Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:30:34
Gefokt voor onderzoek, we hoeven niet precies te weten van welke leverancier de dieren komen. Dus deze zin mag eruit.

Nummer: 4 Auteur: [5.1 lid2e](#) Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:29:43

Nummer: 5 Auteur: [5.1 lid2e](#) Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:57:39

Citaat vraag DEC:

Het doel van dit project is helder. Echter, de noodzaak voor het gebruik van dieren is dat minder. Recent werk laat zien dat men RGCs kan verkrijgen vanuit iPSCs, zie bijvoorbeeld Ji & Tang (2019) en Rabesandratana et al. (2020), maar ook eerder werk bijvoorbeeld Gill et al. (2014), doi: <https://doi.org/10.1167/tvst.3.4.2> en Ohlemacher et al. (2016), <https://doi.org/10.1002/stem.2356>). De [5.1 lid2h](#) vraagt zich af waarom een dergelijke opzet niet wordt gehanteerd? Zo bespaart men dieren en onderzoekt men de betreffende processen direct in humaan weefsel.

Citaat antwoord aanvrager: Zoals hierboven vermeld is ons doel om uiteindelijk met humane retinale ganglioncellen te werken, meer in het bijzonder om de RGCs van de patiënten. We zetten de differentiatie van humane RGCs uit iPSCs op. We beschikken over een analist en een postdoc voor dit project en werken we ook met anderen (PhDs) hieraan. Net als andere laboratoria zoals u hierboven vermeldt, zijn wij nu in staat om uit iPSCs retinaal weefsel te laten differentiëren. In dit weefsel komen ook RGCs tot ontwikkeling getuige de expressie van eiwitten die kenmerkend zijn voor jonge retinale ganglion cellen. Markers van rijpe RGCs (zoals RBPMs) komen nog niet tot expressie. Ook is het nog niet mogelijk om uit dit weefsel de hRGCs te isoleren. De manier zoals we RGCs uit ratten retina's zuiveren, maakt gebruik van het oppervlakte eiwit Thy1. Dit is kennelijk nog niet op de humane RGCs tot expressie gebracht want de isolatie lukt niet. Het is duidelijk dat de rijpheid en de zuivering van hRGCs op dit moment nog veel te wensen overlaten. Ook in de literatuur is hier nog geen goede oplossing voor beschreven. Het is niet bekend hoelang het zal duren voordat de humane RGCs een rijpheid hebben zoals de ratten RGCs. Het is wel duidelijk dat op dit moment de ratten RGCs nog de bench mark vormen.

We hebben in de "Background" de volgende tekst toegevoegd: This PV is part of a larger research plan of our institute to enable personalized medicine for glaucoma patients. In order to achieve this we have established an eye tissue bank, in which patient biomaterial and clinical data of our patients are collected and stored. The biomaterial can provide patient iPSCs. We have started a research project (Postdoc, PhD and technician) to generate RGCs from these iPSCs. At this moment we are able to make retinal organoids in which RGCs develop as judged from staining with early RGC markers (e.g. ISLET1). Yet, they have not matured sufficiently (e.g. no staining with RBPMs). In addition, it is not possible yet to isolate RGCs from these organoids. The protocols for isolation and purification of RGCs from the rat retina employ the surface protein Thy1. In the human organoid cultures apparently this protein has not been expressed sufficiently to enable its use for isolation and purification of human RGCs. At this moment, there is no good protocol available to generate mature and relatively pure hRGCs cultures. For now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

Citaat vraag DEC:

Aansluitend bij vraag 1, vraagt de [5.1 lid2h](#) verder op te helderen waarom iPSCs niet gebruikt kunnen worden voor dit onderzoek.

Antwoord aanvrager: Zoals ook hierboven aangegeven (ons antwoord bij 3.1 Achtergrond), gelden hiervoor de volgende redenen:

- (i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.
- (ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.
- (iii) Het huidige standaard celtypen voor dit werk is de rat isolate RGCs from these organoids. The protocols for isolation and purification of RGCs from the rat retina employ the surface protein Thy1. In the human organoid cultures apparently this protein has not been expressed sufficiently to enable its use for isolation and purification of human RGCs. At this moment, there is no good protocol available to generate mature and relatively pure hRGCs cultures. For now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

Citaat vraag DEC:

Aansluitend bij vraag 1, vraagt de [5.1 lid2h](#) verder op te helderen waarom iPSCs niet gebruikt kunnen worden voor dit onderzoek.

Antwoord aanvrager: Zoals ook hierboven aangegeven (ons antwoord bij 3.1 Achtergrond), gelden hiervoor de volgende redenen:

- (i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.
- (ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.
- (iii) Het huidige standaard celtypen voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucommodellen.

Nummer: 6 Auteur: [5.1 lid2e](#) Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:30:48

Opmerkingen over pagina 2 worden vervolgd op de volgende pagina

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sprague Dawley	1.518	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Er worden voornamelijk jonge ratten (postnatal dag 4 - 10) gebruikt en een beperkt aantal volwassen dieren.

Er is voor deze diersoort gekozen, omdat Citaat:

Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

De pups worden gedood door middel van decapitatie.

De herkomst van de volwassen dieren is onbekend.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de standaard richtlijnen in de Directive 2010/63/EU. De 5.1 lid2h heeft zich hiervan verzekerd op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de IvD als de aanvrager (zie punt F in de bijlage).</p> <p>Citaat C11. De 5.1 lid2h acht het ongerief, mild ongerief bij 100% realistisch ingeschat, zoals nader gepreciseerd in bijlage 1 sectie K. Waar in de 5.1 lid2h discussie over was is de inclusie van 14 moederdieren die (mild) ongerief zouden ondervinden door het wegnemen van alle pups vóór speenleeftijd. Naar beste weten van de DEC-leden valt dit onder fok, en fok is geen dierproef.</p> <p>Citaat C14. Dit punt is uitgebreid besproken en de onderzoekers zijn hierop ook nog bevraagd. In hun antwoord konden zij goed onderbouwen dat er op dit moment nog geen bruikbaar alternatief is waarmee de doelstellingen van de proef behaald kunnen worden. Geschikte cellijnen (of stamcellen)</p>
-------------------	--

Nummer: 7 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:31:17

Wat wil je hiermee zeggen? Voegt niks toe, zou ik weghalen.

ontbreken. Het project (onder background) is verder verduidelijkt op dit punt. De motivatie bestaat uit 3 punten:

(i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.

(ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.

(iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoommodellen.

Punt (i) van de aangevulde motivatie werd nog even betwijfeld door één van de DEC-leden, maar op basis van een schriftelijke ronde onder de DEC-leden is de consensus toch dat de argumenten van de onderzoeker overtuigend zijn. Zij werken zelf mee aan een kantelpunt in dit onderzoek richting gebruik van humane cellen en dan ook naar een afbouw van proefdieren, maar de [5.1 lid 2h](#) is overtuigd dat het kantelpunt op dit moment nog niet helemaal bereikt is, en dus zijn voorlopig ook nog de 'oude' testen op primaire cellen afkomstig van ratten nodig.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het voorgestelde onderzoek naar het nabootsen van glaucoom in gekweekte retinale ganglioncellen middels fysiologische glaucoombevorderaars en celdoodbevorderende stoffen, en de mogelijke remmende werking van medicatie en voedingssupplementen op het celdoodmechanisme in glaucoom, op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?

2. o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: licht nadeel.

o Waarden die voor de onderzoekers en wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de medische wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de glaucoom patiënt bevorderd worden: reëel voordeel.

De ratten ondergaan slechts zeer beperkt ongerief gedurende hun leven, omdat ze niet onderworpen worden aan experimentele interventies. De enige interventie is het doden (pups en volwassen ratten) en verdoven voor doden (volwassen ratten). De aantasting van de integriteit van de ratten is beperkt voor de pups tot het niet kunnen leiden van een natuurlijke levensloop inclusief soortspecifieke gedragingen, en voor zowel pups als volwassen ratten het gedood worden. De onderzoekers

geven aan dat wereldwijd 70 miljoen mensen leiden aan glaucoma, waarbij 10% uiteindelijk blind wordt. In Nederland gaat het om 162.500 mensen met glaucoma. De 5.1 lid2h is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen met glaucoom zwaarder weegt dan de belangen/waarden van de proefdieren.

3. De 5.1 lid2h beantwoordt de centrale morele vraag (zie hierboven punt 1.) bevestigend. De 5.1 lid2h heeft verschillende vragen gesteld over het voorstel, zie hieronder in bijlage I. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verder ontwikkelen van een model om de mechanistische oorzaak van glaucoom te onderzoeken en deze kennis vervolgens te gebruiken voor de ontwikkeling van therapieën. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen en te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen. Op grond van deze overwegingen beschouwt de 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Modelling glaucoma in cell culture to develop new therapies" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h dit projectvoorstel van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd

Er zijn vragen gesteld over de achtergrond, doel, bijlage 1 en de onderzoeksstrategieën.


Het DEC advies is Positief


¹ Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



²

Pagina: 4

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:34:28

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:35:07

Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies betreft een meerderheidsstandpunt. Eén lid nam een minderheidsstandpunt in. De argumentatie hierbij was dat de aanvraag niet lijkt te voldoen aan de 'V' van Vervanging. Volgens de nieuwste inzichten en technieken kunnen mature RCGs (blijkens bijvoorbeeld BRN3A and RBPMS expressie) ook verkregen worden uit iPSCs, middels THY1 (Rabesandratana et al., 2020). Gezien het startpunt van de intrinsieke waarde van het dier, vervalt overeenkomstig dit minderheidsstandpunt de noodzaak tot het gebruik van ratten RCGs *ex vivo*.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. Ook heeft u aandacht besteed aan punten die volgens u aandacht behoeven. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	5.1 lid 2e
Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: General aim of the research program is to develop treatments (e.g. drugs, dietary supplements) that prevent loss of RGCs in glaucoma. Currently, no neuroprotective drugs are clinically available to treat glaucoma. In the present project, we set up in vitro models with rodent RGCs using several glaucoma triggers. These models will be used to study the mechanism(s) of glaucoma pathology in these cells. In addition, these models can be used to develop and test possible treatments and drugs. This objective is achievable because rodent RGCs can be isolated, cultured in vitro and exposed to cell death triggers, thus modelling glaucoma. This has been done in other labs, e.g. by mimicking the effects of high IOP in vitro, and these techniques are now also operational in our lab. The mechanism of RGC death can be studied with well-known techniques, such as gene expression profiling and live cell microscopic imaging. These techniques are operational in our laboratory and within our professional network. In the in vitro glaucoma models, neuroprotective agents can be developed and tested. Rodent RGCs are often used with this purpose (e.g. Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50). If these agents (drugs, dietary supplements) are effective in the in vitro models, clinical trials can be initiated to bring the treatments to the patients.</p>

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. This project will identify mechanisms of RGC death in a model of glaucoma. This is scientifically of interest for our understanding of glaucoma and for our understanding of survival of neurons in general. Since glaucoma is a multifactorial, heterogeneous disorder, we will study the effects of several glaucoma risk factors and triggers in order to be relevant for a wide range of glaucoma patients. 2. We will study whether the cell death program, once activated, can be stopped and reversed in RGCs (and neurons in general). This reversal of cell death, called anastasis, has been demonstrated for other cell types but not yet for neurons of the central nervous system. 3. We will develop new drugs / dietary supplements for protecting the RGCs (and the optic nerve) of glaucoma patients. In the Netherlands, estimates indicate that 162.500 people have glaucoma. Worldwide, glaucoma affects 70 million people and causes blindness of 7 million people. No cure is available. The only treatment modality is to lower the IOP. Yet, this treatment often does not suffice. End-of-life blindness still amounts to 10% of patients, also in the Netherlands.
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.
<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7'. Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep volop aanwezig gezien de jarenlange ervaring met RGC-modellen. Het werk is een logische voortzetting van een eerder project 5.1 lid2h 5.1 lid2h waarin de techniek van RGC isolatie en in vitro-kweek werd opgezet, gevolgd door ontwikkeling van ingrepen die het glaucoomproces nabootsen. Er wordt ook helder beschreven hoe het werkveld zich wereldwijd ontwikkelt en dat dit project in de frontlinie van het glaucoom-onderzoek staat.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments. There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57). We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model. The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age. Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria. In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (IPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human IPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Verminderen

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped. All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12). We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful. It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.

- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).

- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.


- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers.


We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").

- We will use the mothers more than one time if possible.

- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible. We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat: Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently. We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals. The choice for our in vitro approach, implies that no in vivo glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used. Application of bio-informatics for in silico analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test in silico potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments. Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".</p>
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Voldoende onderbouwd  ¹	

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.  ²
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat: We intend to re-use the mothers for breeding . In a small percentage this may result in mild discomfort in case all offspring are used	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	Ja	volgens de richtlijn.

Pagina: 9

Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:38:19

Dit zal wel een MAUS dingetje zijn maar het komt er zo echt ongelukkig uit. Kijk even waar het staat, anders misschien weglaten. Of uitleggen wat voldoende onderbouwd is.

Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:39:16

Geen hergebruik. Moedervrouwtjes vallen niet onder deze vergunning. Dus bij hergebruik nee invullen.

Naam proef		
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	HEP: Worden niet verwacht	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Dit projectvoorstel is een vervolg op AVC **5.1 lid2h** waarin de proef werd uitgevoerd met Brown Norway strain. Vanwege de nestgrootte wordt in dit project voor Sprague-Dawley ratten gekozen.

Er zijn heldere GO / NO GO momenten beschreven zie flow chart 3.4.1.

7e pups worden gedood door middel van decapitatie. Er is aan de aanvrager gevraagd waarom er voor deze dodingsmethode wordt gekozen.

5.2 lid1

5.2 lid1
















aanvrager is gevraagd om de toelichting te geven van de herkomst van de dieren. In de aanvraag is niet beschreven welke geslachten gebruikt worden. De aanvrager is verzocht om dit toe te lichten.

Er zijn vragen gesteld over de NTS. De aanvrager is verzocht om de terminologie te vereenvoudigen.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

Pagina: 10

-
-  Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:42:01
Ik zou kort vermelden wat dit project inhoudelijk inhoud, dus iets van waarbij het doel was om primaire celkweek te optimaliseren en het opzetten van een in vitro model voor glaucoma.
-
-  Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:48:31
-
-  Nummer: 3 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:48:20
-
-  Nummer: 4 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 18:02:13
Weghalen
-
-  Nummer: 5 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:48:03
-
-  Nummer: 6 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:47:54
De pups in deze projectaanvraag zullen worden gedecapiteerd. Deze manier van doden van pup is een voor de NWWA geaccepteerde methode.
-
-  Nummer: 7 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:47:59
-
-  Nummer: 8 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 18:02:35
5.2 lid1
-
-  Nummer: 9 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:48:44
-
-  Nummer: 10 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 18:02:54
Weghalen
-
-  Nummer: 11 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:48:54
-
-  Nummer: 12 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 18:03:29
Is voldoende onderbouwd, weghalen.
-
-  Nummer: 13 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Markering Datum: 10-5-2021 17:49:12
-
-  Nummer: 14 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 17:52:06
Het advies van de DEC is tot stand gekomen met een meerderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of er wordt voldaan aan de V van vervanging in deze projectaanvraag. **5.2 lid1**
-
-  Nummer: 15 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 10-5-2021 18:03:49
en verhullend taalgebruik aan te passen.

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

Datum 07 mei 2021
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114405

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
Aanvraagnummer: AVD202114405
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld:</p> <p>5.2 lid1</p> <p>- Het is voor ons niet duidelijk of u mannelijke/vrouwelijke of beide geslachten van pups gebruikt in uw proef. Ook van de volwassen dieren is niet duidelijk welk geslacht dit betreft. Kunt u een toelichting geven over het geslachten van de proefdieren?</p> <p>5.2 lid1</p> <p>5.2 lid1</p> <p>Vragen over de NTS:</p> <p>- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld moleculaire processen, gedifferentieerde en euthanaseren) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.</p>
---------------	--

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research				
	Ratten (Rattus norvegicus)	Sprague Dawley	1.518	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

Ratten (Rattus norvegicus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Er worden voornamelijk jonge ratten (postnatal dag 4 - 10) gebruikt en een beperkt aantal volwassen dieren.

Er is voor deze diersoort gekozen, omdat Citaat:

Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

De pups worden gedood door middel van decapitatie.

De herkomst van de volwassen dieren is onbekend.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de standaard richtlijnen in de Directive 2010/63/EU. De 5.1 lid2h heeft zich hiervan verzekerd op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de IvD als de aanvrager (zie punt F in de bijlage).</p> <p>Citaat C11. De 5.1 lid2h acht het ongerief, mild ongerief bij 100% realistisch ingeschat, zoals nader gepreciseerd in bijlage 1 sectie K. Waar in de 5.1 lid2h discussie over was is de inclusie van 14 moederdieren die (mild) ongerief zouden ondervinden door het wegnemen van alle pups vóór speenleeftijd. Naar beste weten van de DEC-leden valt dit onder fok, en fok is geen dierproef.</p> <p>Citaat C14. Dit punt is uitgebreid besproken en de onderzoekers zijn hierop ook nog bevraagd. In hun antwoord konden zij goed onderbouwen dat er op dit moment nog geen bruikbaar alternatief is waarmee de doelstellingen van de proef behaald kunnen worden. Geschikte cellijnen (of stamcellen)</p>
-------------------	---

ontbreken. Het project (onder background) is verder verduidelijkt op dit punt. De motivatie bestaat uit 3 punten:

(i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.

(ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.

(iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoommodellen.

Punt (i) van de aangevulde motivatie werd nog even betwijfeld door één van de DEC-leden, maar op basis van een schriftelijke ronde onder de DEC-leden is de consensus toch dat de argumenten van de onderzoeker overtuigend zijn. Zij werken zelf mee aan een kantelpunt in dit onderzoek richting gebruik van humane cellen en dan ook naar een afbouw van proefdieren, maar de [5.1 lid2h](#) is overtuigd dat het kantelpunt op dit moment nog niet helemaal bereikt is, en dus zijn voorlopig ook nog de 'oude' testen op primaire cellen afkomstig van ratten nodig.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het voorgestelde onderzoek naar het nabootsen van glaucoom in gekweekte retinale ganglioncellen middels fysiologische glaucoombevorderaars en celdoodbevorderende stoffen, en de mogelijke remmende werking van medicatie en voedingssupplementen op het celdoodmechanisme in glaucoom, op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt aangedaan?

2. o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: licht nadeel.

o Waarden die voor de onderzoekers en wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de medische wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de glaucoom patiënt bevorderd worden: reëel voordeel.

De ratten ondergaan slechts zeer beperkt ongerief gedurende hun leven, omdat ze niet onderworpen worden aan experimentele interventies. De enige interventie is het doden (pups en volwassen ratten) en verdoven voor doden (volwassen ratten). De aantasting van de integriteit van de ratten is beperkt voor de pups tot het niet kunnen leiden van een natuurlijke levensloop inclusief soortspecifieke gedragingen, en voor zowel pups als volwassen ratten het gedood worden. De onderzoekers

geven aan dat wereldwijd 70 miljoen mensen leiden aan glaucoma, waarbij 10% uiteindelijk blind wordt. In Nederland gaat het om 162.500 mensen met glaucoma. De **5.1 lid2h** is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen met glaucoom zwaarder weegt dan de belangen/waarden van de proefdieren.

3. De **5.1 lid2h** beantwoordt de centrale morele vraag (zie hierboven punt 1.) bevestigend. De **5.1 lid2h** heeft verschillende vragen gesteld over het voorstel, zie hieronder in bijlage I. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verder ontwikkelen van een model om de mechanistische oorzaak van glaucoom te onderzoeken en deze kennis vervolgens te gebruiken voor de ontwikkeling van therapieën. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen en te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen. Op grond van deze overwegingen beschouwt de **5.1 lid2h** de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Modelling glaucoma in cell culture to develop new therapies" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de **5.1 lid2h** dit projectvoorstel van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd
Er zijn vragen gesteld over de achtergrond, doel, bijlage 1 en de onderzoeksstrategieën.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. Ook heeft u aandacht besteed aan punten die volgens u aandacht behoeven. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	5.1 lid2e
Doelstelling Doelstelling	<p>Citaat: General aim of the research program is to develop treatments (e.g. drugs, dietary supplements) that prevent loss of RGCs in glaucoma. Currently, no neuroprotective drugs are clinically available to treat glaucoma. In the present project, we set up in vitro models with rodent RGCs using several glaucoma triggers. These models will be used to study the mechanism(s) of glaucoma pathology in these cells. In addition, these models can be used to develop and test possible treatments and drugs. This objective is achievable because rodent RGCs can be isolated, cultured in vitro and exposed to cell death triggers, thus modelling glaucoma. This has been done in other labs, e.g. by mimicking the effects of high IOP in vitro, and these techniques are now also operational in our lab. The mechanism of RGC death can be studied with well-known techniques, such as gene expression profiling and live cell microscopic imaging. These techniques are operational in our laboratory and within our professional network. In the in vitro glaucoma models, neuroprotective agents can be developed and tested. Rodent RGCs are often used with this purpose (e.g. Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50). If these agents (drugs, dietary supplements) are effective in the in vitro models, clinical trials can be initiated to bring the treatments to the patients.</p>

Wetenschappelijk en maatschappelijk belang	<p>Citaat:</p> <p>1. This project will identify mechanisms of RGC death in a model of glaucoma. This is scientifically of interest for our understanding of glaucoma and for our understanding of survival of neurons in general. Since glaucoma is a multifactorial, heterogeneous disorder, we will study the effects of several glaucoma risk factors and triggers in order to be relevant for a wide range of glaucoma patients.</p> <p>2. We will study whether the cell death program, once activated, can be stopped and reversed in RGCs (and neurons in general). This reversal of cell death, called anastasis, has been demonstrated for other cell types but not yet for neurons of the central nervous system.</p> <p>3. We will develop new drugs / dietary supplements for protecting the RGCs (and the optic nerve) of glaucoma patients. In the Netherlands, estimates indicate that 162.500 people have glaucoma. Worldwide, glaucoma affects 70 million people and causes blindness of 7 million people. No cure is available. The only treatment modality is to lower the IOP. Yet, this treatment often does not suffice. End-of-life blindness still amounts to 10% of patients, also in the Netherlands.</p>
Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang	Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.
Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek	<p>Citaat DEC advies C7'.</p> <p>Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep volop aanwezig gezien de jarenlange ervaring met RGC-modellen. Het werk is een logische voortzetting van een eerder project 5.1 lid2h</p> <p>waarin de techniek van RGC isolatie en in vitro-kweek werd opgezet, gevolgd door ontwikkeling van ingrepen die het glaucoomproces nabootsen. Er wordt ook helder beschreven hoe het werkveld zich wereldwijd ontwikkelt en dat dit project in de frontlinie van het glaucoom-onderzoek staat.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twijfelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>

3V's

Vervanging

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments. There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57). We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model. The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age. Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria. In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (IPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human IPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Verminderen

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped. All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12). We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful. It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.

- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).

- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.

- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers.

We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").

- We will use the mothers more than one time if possible.

- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible. We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat: Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently. We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals. The choice for our in vitro approach, implies that no in vivo glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used. Application of bio-informatics for in silico analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test in silico potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments. Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".</p>
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Voldoende onderbouwd	

Hergebruik	Er is sprake van hergebruik van dieren.
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat: We intend to re-use the mothers for breeding . In a small percentage this may result in mild discomfort in case all offspring are used	

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	HEP: Worden niet verwacht	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Dit projectvoorstel is een vervolg op AVD **5.1 lid2h** waarin de proef werd uitgevoerd met Brown Norway strain. Vanwege de nestgrootte wordt in dit project voor Sprague-Dawley ratten gekozen.

Er zijn heldere GO / NO GO momenten beschreven zie flow chart 3.4.1.

De pups worden gedood door middel van decapitatie. Er is aan de aanvrager gevraagd waarom er voor deze dodingsmethode wordt gekozen.

5.2 lid1

5.2 lid1

De aanvrager is gevraagd om de toelichting te geven van de herkomst van de dieren. In de aanvraag is niet beschreven welke geslachten gebruikt worden. De aanvrager is verzocht om dit toe te lichten.

Er zijn vragen gesteld over de NTS. De aanvrager is verzocht om de terminologie te vereenvoudigen.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



Advies aan CCD

Datum 12 mei 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114405

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
Aanvraagnummer: AVD202114405
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

Proces	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC.</p> <p>De volgende vragen zijn aan de aanvrager gesteld:</p> <ul style="list-style-type: none">- Kunt u onderbouwen of u beide geslachten pups en volwassen dieren in uw onderzoek gebruikt? Kunt u deze informatie ook aanvullen in de bijlage dierproeven?- U heeft de foster moeders in de bijlage opgeteld bij de aantallen dieren. Deze dieren zijn echter niet vergunningplichtig. Kunt u deze 14 dieren weghalen en de aantallen in de bijlage kloppend maken? Kunt u zorgen dat de aantallen in de NTS consistent zijn met de aantallen in de projectaanvraag? <p>Vragen over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none">- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld moleculaire processen, gedifferentieerde en euthanaseren) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.- U spreekt in de NTS bij what procedures are typically used, en de expected harms over het euthanaseren van de dieren. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden?
---------------	---

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sprague Dawley	1.504	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Er worden voornamelijk jonge ratten (postnatal dag 4 - 10) gebruikt en een beperkt aantal volwassen dieren.

Er is voor deze diersoort gekozen, omdat Citaat:

Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

De pups worden gedood door middel van decapitatie.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat vraag 1 DEC:</p> <p>Het doel van dit project is helder. Echter, de noodzaak voor het gebruik van dieren is dat minder. Recent werk laat zien dat men RGCs kan verkrijgen vanuit iPSCs, zie bijvoorbeeld Ji & Tang (2019) en Rabesandratana et al. (2020), maar ook eerder werk bijvoorbeeld Gill et al. (2014), doi: https://doi.org/10.1167/tvst.3.4.2 en Ohlemacher et al. (2016), https://doi.org/10.1002/stem.2356). De 5.1 lid2h vraagt zich af waarom een dergelijke opzet niet wordt gehanteerd? Zo bespaart men dieren en onderzoekt men de betreffende processen direct in humaan weefsel.</p> <p>Citaat antwoord 1 aanvrager:</p> <p>Zoals hierboven vermeld is ons doel om uiteindelijk met humane retinale ganglioncellen te werken, meer in het bijzonder om de RGCs van de patiënten. We zetten de differentiatie van humane RGCs uit iPSCs op. We beschikken over een analist en een postdoc voor dit project en werken we ook met anderen (PhDs) hieraan. Net als andere laboratoria zoals u hierboven vermeldt, zijn wij nu in staat om uit iPSCs retinaal weefsel te laten differentiëren. In dit weefsel komen ook RGCs tot ontwikkeling getuige de expressie van eiwitten die kenmerkend zijn voor jonge retinale</p>
-------------------	--

ganglion cellen. Markers van rijpe RGCs (zoals RBPMS) komen nog niet tot expressie. Ook is het nog niet mogelijk om uit dit weefsel de hRGCs te isoleren. De manier zoals we RGCs uit ratten retina's zuiveren, maakt gebruik van het oppervlakte eiwit Thy1. Dit is kennelijk nog niet op de humane RGCs tot expressie gebracht want de isolatie lukt niet. Het is duidelijk dat de rijpheid en de zuivering van hRGCs op dit moment nog veel te wensen overlaten. Ook in de literatuur is hier nog geen goede oplossing voor beschreven. Het is niet bekend hoelang het zal duren voordat de humane RGCs een rijpheid hebben zoals de ratten RGCs. Het is wel duidelijk dat op dit moment de ratten RGCs nog de bench mark vormen.

We hebben in de "Background" de volgende tekst toegevoegd: This PV is part of a larger research plan of our institute to enable personalized medicine for glaucoma patients. In order to achieve this we have established an eye tissue bank, in which patient biomaterial and clinical data of our patients are collected and stored. The biomaterial can provide patient iPSCs. We have started a research project (Postdoc, PhD and technician) to generate RGCs from these iPSCs. At this moment we are able to make retinal organoids in which RGCs develop as judged from staining with early RGC markers (e.g. ISLET1). Yet, they have not matured sufficiently (e.g. no staining with RBPMS). In addition, it is not possible yet to isolate RGCs from these organoids. The protocols for isolation and purification of RGCs from the rat retina employ the surface protein Thy1. In the human organoid cultures apparently this protein has not been expressed sufficiently to enable its use for isolation and purification of human RGCs. At this moment, there is no good protocol available to generate mature and relatively pure hRGCs cultures. For now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

Citaat vraag 14 DEC:

Aansluitend bij vraag 1, vraagt de [5.1 lid2h](#) verder op te helderen waarom iPSCs niet gebruikt kunnen worden voor dit onderzoek.

Citaat antwoord 14 aanvrager:

Zoals ook hierboven aangegeven (ons antwoord bij 3.1 Achtergrond), gelden hiervoor de volgende redenen:

- (i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.
- (ii) Mede hierdoor (c.q. expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.
- (iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane

RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoomodellen.

Citaat C11.

De **5.1 lid2h** acht het ongerief, mild ongerief bij 100% realistisch ingeschat, zoals nader gepreciseerd in bijlage 1 sectie K. Waar in de **5.1 lid2h** discussie over was is de inclusie van 14 moederdieren die (mild) ongerief zouden ondervinden door het wegnemen van alle pups vóór speenleeftijd. Naar beste weten van de DEC-leden valt dit onder fok, en fok is geen dierproef.

Citaat C14.

Dit punt is uitgebreid besproken en de onderzoekers zijn hierop ook nog bevraagd. In hun antwoord konden zij goed onderbouwen dat er op dit moment nog geen bruikbaar alternatief is waarmee de doelstellingen van de proef behaald kunnen worden. Geschikte cellijnen (of stamcellen) ontbreken. Het project (onder background) is verder verduidelijkt op dit punt. De motivatie bestaat uit 3 punten:

(i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.

(ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.

(iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoomodellen.

Punt (i) van de aangevulde motivatie werd nog even betwijfeld door één van de DEC-leden, maar op basis van een schriftelijke ronde onder de DEC-leden is de consensus toch dat de argumenten van de onderzoeker overtuigend zijn. Zij werken zelf mee aan een kantelpunt in dit onderzoek richting gebruik van humane cellen en dan ook naar een afbouw van proefdieren, maar de **5.1 lid2h** is overtuigd dat het kantelpunt op dit moment nog niet helemaal bereikt is, en dus zijn voorlopig ook nog de 'oude' testen op primaire cellen afkomstig van ratten nodig.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het voorgestelde onderzoek naar het nabootsen van glaucoom in gekweekte retinale ganglioncellen middels fysiologische glaucoombevorderaars en celdoodbevorderende stoffen, en de mogelijke remmende werking van medicatie en voedingssupplementen op het celdoodmechanisme in glaucoom, op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt

aangedaan?

2. o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: licht nadeel.

o Waarden die voor de onderzoekers en wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de medische wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de glaucoom patiënt bevorderd worden: reëel voordeel.

De ratten ondergaan slechts zeer beperkt ongerief gedurende hun leven, omdat ze niet onderworpen worden aan experimentele interventies. De enige interventie is het doden (pups en volwassen ratten) en verdoven voor doden (volwassen ratten). De aantasting van de integriteit van de ratten is beperkt voor de pups tot het niet kunnen leiden van een natuurlijke levensloop inclusief soortspecifieke gedragingen, en voor zowel pups als volwassen ratten het gedood worden. De onderzoekers geven aan dat wereldwijd 70 miljoen mensen leiden aan glaucoma, waarbij 10% uiteindelijk blind wordt. In Nederland gaat het om 162.500 mensen met glaucoma. De [5.1 lid2h](#) is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen met glaucoom zwaarder weegt dan de belangen/waarden van de proefdieren.

3. De [5.1 lid2h](#) beantwoordt de centrale morele vraag (zie hierboven punt 1.) bevestigend. De [5.1 lid2h](#) heeft verschillende vragen gesteld over het voorstel, zie hieronder in bijlage I. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verder ontwikkelen van een model om de mechanistische oorzaak van glaucoom te onderzoeken en deze kennis vervolgens te gebruiken voor de ontwikkeling van therapieën. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen en te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen. Op grond van deze overwegingen beschouwt de [5.1 lid2h](#) de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Modelling glaucoma in cell culture to develop new therapies" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de [5.1 lid2h](#) dit projectvoorstel van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

	<p>- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd Er zijn vragen gesteld over de achtergrond, doel, bijlage 1 en de onderzoeksstrategieën.</p> <p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Citaat: Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies betreft een meerderheidsstandpunt. Eén lid nam een minderheidsstandpunt in. De argumentatie hierbij was dat de aanvraag niet lijkt te voldoen aan de 'V' van Vervanging. Volgens de nieuwste inzichten en technieken kunnen mature RCGs (blijkens bijvoorbeeld BRN3A and RBPMs expressie) ook verkregen worden uit hIPSCs, middels THY1 (Rabesandratana et al., 2020). Gezien het startpunt van de intrinsieke waarde van het dier, vervalt overeenkomstig dit minderheidsstandpunt de noodzaak tot het gebruik van ratten RCGs ex vivo.</p>
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. Ook heeft u aandacht besteed aan punten die volgens u aandacht behoeven. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	<p>5.2 lid1 </p>
--------------------------------	---

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: General aim of the research program is to develop treatments (e.g. drugs, dietary supplements) that prevent loss of RGCs in glaucoma. Currently, no neuroprotective drugs are clinically available to treat glaucoma. In the present project, we set up in vitro models with rodent RGCs using several glaucoma triggers. These models will be used to study the mechanism(s) of glaucoma pathology in these cells. In addition, these models can be used to develop and test possible treatments and drugs. This objective is achievable because rodent RGCs can be isolated, cultured in vitro and exposed to cell death triggers, thus modelling glaucoma. This has been done in other labs, e.g. by mimicking the effects of high IOP in vitro, and these techniques are now also operational in our lab. The mechanism of RGC death can be studied with well-known techniques, such as gene expression profiling and live cell microscopic imaging. These techniques are operational in our laboratory and within our professional network. In the in vitro glaucoma models, neuroprotective agents can be developed and tested. Rodent RGCs are often used with this purpose (e.g. Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50). If these agents (drugs, dietary supplements) are effective in the in vitro models, clinical trials can be initiated to bring the treatments to the patients.</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: 1. This project will identify mechanisms of RGC death in a model of glaucoma. This is scientifically of interest for our understanding of glaucoma and for our understanding of survival of neurons in general. Since glaucoma is a multifactorial, heterogeneous disorder, we will study the effects of several glaucoma risk factors and triggers in order to be relevant for a wide range of glaucoma patients. 2. We will study whether the cell death program, once activated, can be stopped and reversed in RGCs (and neurons in general). This reversal of cell death, called anastasis, has been demonstrated for other cell types but not yet for neurons of the central nervous system. 3. We will develop new drugs / dietary supplements for protecting the RGCs (and the optic nerve) of glaucoma patients. In the Netherlands, estimates indicate that 162.500 people have glaucoma. Worldwide, glaucoma affects 70 million people and causes blindness of 7 million people. No cure is available. The only treatment modality is to lower the IOP. Yet, this treatment often does not suffice. End-of-life blindness still amounts to 10% of patients, also in the Netherlands.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.</p>

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7'. Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep volop aanwezig gezien de jarenlange ervaring met RGC-modellen. Het werk is een logische voortzetting van een eerder project 5.1 lid2h [redacted] waarin de techniek van RGC isolatie en in vitro-kweek werd opgezet, gevolgd door ontwikkeling van ingrepen die het glaucoomproces nabootsen. Er wordt ook helder beschreven hoe het werkveld zich wereldwijd ontwikkelt en dat dit project in de frontlinie van het glaucoom-onderzoek staat.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	--

3V's

Vervanging

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments. There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57). We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model. The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age. Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria. In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (IPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human IPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Verminderen

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped. All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12). We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful. It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.

- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).

- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.

- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers.

We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").

- We will use the mothers more than one time if possible.

- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible. We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat: Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently. We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals. The choice for our in vitro approach, implies that no in vivo glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used. Application of bio-informatics for in silico analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test in silico potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments. Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".</p>

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	HEP: Worden niet verwacht	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het advies van de DEC is tot stand gekomen met een meerderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of er wordt voldaan aan de V van vervanging in deze projectaanvraag. 5.2 lid1

Dit projectvoorstel is een vervolg op AVD5.1 lid2h waarbij het doel was om primaire celweek te optimaliseren en het opzetten van een in vitro model voor glaucoma.

De pups worden gedood door middel van decapitatie. Deze manier van doden van pup is een voor de NVWA geaccepteerde methode.

De aanvrager heeft de moederdieren meegerekend in het projectvoorstel, deze zijn echter niet vergunningsplichtig. Hierdoor vervalt het hergebruik en zullen er 14 dieren minder in aantal op de vergunning komen. De aanvrager is gevraagd om de stukken aan te passen. De aanvrager is gevraagd om te onderbouwen of beide geslachten worden gebruikt.

Er zijn vragen gesteld over de NTS. De aanvrager is verzocht om de terminologie te vereenvoudigen en verhullend taalgebruik aan te passen.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 12 mei 2021 15:55
Aan: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114405

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 14-01-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114405. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

- De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld moleculaire processen en, gedifferentieerde) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten.

- U spreekt in de NTS bij what procedures are typically used, en de expected harms over het euthanaseren van de dieren. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden?

Onduidelijkheden

- Kunt u onderbouwen of u beide geslachten pups en volwassen dieren in uw onderzoek gebruikt? Kunt u deze informatie ook aanvullen in de bijlage dierproeven?

- U heeft de foster moeders in de bijlage opgeteld bij de aantallen dieren. Deze dieren zijn echter niet vergunningplichtig. Kunt u deze 14 dieren weghalen en de aantallen in de bijlage kloppend maken? Kunt u zorgen dat de aantallen in de NTS consistent zijn met de aantallen in de projectaanvraag? Deze dieren tellen ook niet mee voor hergebruik. Kunt u dit in de bijlage onder punt C aanpassen?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

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 the current research project, we focus on retinal ganglion cells (RGCs) since the loss of these specific cells represents the irreversible step in glaucoma pathology. General aim of the research project is to develop new treatments to prevent the loss of RGCs in glaucoma. We will do this by mimicking the RGC cell death of glaucoma *in vitro*, study the disease mechanisms and then develop and test neuroprotective treatments.

In order to model RGC cell death *in vitro*, RGCs are required. In this project, we will employ primary cultures of rat RGCs. (for justification of this choice see below "D, Replacement"). The purpose of the animal procedure described in this appendix is to provide suitable rat RGCs for the glaucoma disease modeling which aims to develop new glaucoma drugs. The primary output parameter of the animal procedure will be the yield of suitable RGCs for the *in vitro* glaucoma models.

General design of the animal procedures:

The rats are euthanized, without prior experimentation. The eyes are taken out and further processed.

Isolation and purification of the RGCs occurs according to established protocols, that are operational in our laboratory. Next, the RGCs are used in experiments aimed at developing neuroprotective drugs and treatments.

In work packages 1- 3 early postnatal animals will be used since at this stage the yield of viable and well differentiated RGCs is optimal (Winzeler and Wang 2014, *Cold Spring Harb Protoc*; 2013; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961).

In work package 4, also adult animals are used in order to verify that the molecular targets identified in the current project are also present in the adult retina.

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

Early postnatal rat pups (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation. Adult animals will be first anesthetized and then killed. After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.

These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

The other organs may be removed and donated to other research projects.

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

As stated in the project proposal form, the animal experiments are needed for 4 different work packages:

1. Set up *in vitro* glaucoma models
2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)
3. Develop and test new neuroprotective treatments
4. Study the ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2

To minimize the number of animals required, we first use immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up and optimize all required techniques. Only if a method or technique is successfully set up using PC12 cells, will we continue with rat cells (GO / NO GO criterium).

GO / NO GO criteria: For each glaucoma model progression from WP1 to WP2 only possible when WP1 is successfully completed. Similarly, only after completion of WP2, WP3 can be started. WP4 can be done in parallel with WP3 (also see flow chart in project proposal).

We will use statistical methods to demonstrate significant effects in our experiments. In the scientific literature of this type of experiments (pathology models using primary rodent RGCs cultures), generally parametric statistical tests (Student's T test, one- and two-sided ANOVA, $P < 0.05$) are used. The sample size is the number of biological replicates, i.e. the number of individual RGC isolations, each using a pool of biologically different retina's to isolate RGCs. Each biological replicate contains sufficient RGCs to allow technical replicates of the measurements in order to keep the standard deviation of the measurement low.

Examining the literature we found that the samples size for this kind of experiments generally is 3 to 7. In rare instances, higher samples sizes are used. Since we are interested in large effects, we are confident that a sample size of max 7 will be sufficient for our project.

A good illustration is a recent study in *J Mol Biol*, on lactate-mediated protection in retinal ganglion cells (Vohra et al 2019, *J. Mol Biol.* 143: 1878-1888). In this study, several different types of experiments were done each demonstrating significant effects, each using different samples sizes, ranging from 3 to 7. Therefore, a sample size of max 7 likely is sufficient for these type of experiments to obtain biologically meaningful results. In our experiments (see below) we will therefore, request sufficient rats to achieve a maximum sample size of 7. Yet, this maximum will not always be needed and we will start the experiments with a lower sample size and see whether this is sufficient to significantly demonstrate the biological effect.

We selected those analysis techniques that generate relatively much information from limited use of animals. These techniques are:

- 1) Live, single cell imaging, which requires less cells than many other, cell biology methods.

2) RNA sequencing to comprehensively analyse the molecular mechanisms of RGC cell death.

B. The animals

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

Species: rat, wild type

Choice for rats:

The rat is most widely used for generating primary RGC cultures (pioneering work of dr. Barres: *Barres et al. 1988, Neuron 1: 791-803*) and modelling glaucoma (e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*). Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

Origin:

We will obtain the animals from certified suppliers or from local breeding.

Life stage:

Early postnatal rats are used since this stage is optimal for providing cultures of viable, well-differentiated RGCs (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961*).

In addition, a limited number of adult animals is required (in work package 4) to determine the localization of expression of proteins, that are found in work package 2 to be important for RGC cell death.

Strategy for breeding and using pups:

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest. We aim to leave at least 2 pups with the mother. Our method of isolation of RGCs requires a minimum of 4 pups (8 retina's) for each isolation, which means that we would like to have at least 6 pups per litter. This generally will be the case (we use the strain Sprague Dawley which has average litter size of 10.5). In addition, we can use more than one breeding pair if we need many pups. Yet, there always is the possibility that there will be less than 6 pups born. If there are less than 4, we cannot and will not perform the experiment. If there are 4 or 5 pups born, we will choose to use the complete nest. This will lead to discomfort to the mother but otherwise would lead to 4 to 5 pups being killed without use.

In addition, we will try to re-use the mothers as much as possible.

Estimated numbers:

The number of animals required was estimated on the basis of our pilot studies and previous published studies in the literature using similar materials, methods and research questions. As indicated above, a maximum sample size of 7 apparently is sufficient for most of these experiments to obtain meaningful results.

Also relevant is the yield of RGCs per rat. Yields of RGCs according to the published protocols (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906*) are 30,000 cells for early postnatal rat retina. In our hands, the yield of RGCs were on average approximately 20000 viable RGCs per retina, which means 40000 RGCs per animal, for use in our experiments.

Calculation of the numbers of animals needed for the experiments:

The rat RGCs are needed for multiple, diverse studies. In the project proposal form we listed the following 4 work packages (WP):

WP 1. Set up in vitro glaucoma models

WP 2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

WP 3. Develop and test new neuroprotective treatments

WP 4. Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in WP 2

WP 1: Set up in vitro glaucoma models

Max 168 pups required

Calculation: We will set up glaucoma *in vitro* models with the following triggers: 1) mechanical stress, 2) mitochondrial dysfunction, 3) ethanol and 4) staurosporine. For each of these models, we will first set up all techniques using a neuronal cell line (e.g. PC12). After that, we will perform experiments with primary RGCs to explore the sensitivity of RGCs for the trigger and select the optimal conditions for the trigger.

To measure the effect of the cell death triggers, we examine cells seeded on coverslips. Each coverslip is seeded with 20000 cells. One coverslip is required for cell death assessment; a second coverslip is used for morphology. Multiple positions on the coverslip will be imaged in order to get a fair estimate of the effect of the trigger. For each glaucoma model, we aim to find the conditions of the experimental parameters that define max. 6 experimental groups, including the control. For example for mechanical stress, we expect to use hydrostatic pressure of 0, 35 and 70 mmHg, with two durations (e.g. 8 hrs and 24 hrs), which means 6 experimental groups. For each group two coverslips are needed for assessment: We need 12 coverslips for one independent experiment, performed with cells from one independent RGC isolation. We will use max seven experiments to set up and establish each disease model.

Calculation:

Each cell death trigger: max. 84 coverslips, each containing 20000 cells. Isolation of RGCs of rats of postnatal day 7 yields 40000 cells per rat. Per trigger 42 pups are required.

In total for 4 triggers: $4 \times 42 = \text{max. } 168$ pups

WP 2: Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

- WP 2A: Cell biology/live-imaging: max 42 pups

We will study the cell death process in each disease model in detail with live cell imaging using light microscopy and correlative electron microscopy. In these live imaging experiments, single cells are examined (various single cells at several positions in each experiment). Our pilot experiments with PC12 cells have shown that 10000 cells per slide are sufficient to obtain an adequate cell sampling for reliable measurement. In each imaging session, six conditions are imaged (control, plus five experimental conditions for assessing the cell death mechanism). This means that cells of 3 eyes are required for each imaging experiment. We will replicate each imaging experiment max 7 times with independent RGC isolations in order to document the involved cell death program. To study this in four disease models, we require in total 42 pups.

- WP 2B: Molecular biology / biochemistry: max 420 pups

Biochemical experiments (RNAseq) will be done for the cell death triggers (4) and various time points (max 2) and trigger strengths (max 3, including the control).

For RNAseq, 2 microgram of total RNA is recommended per sample by commercial sequencing companies (e.g. https://cdn2.hubspot.net/hubfs/3478602/Campaigns/EU/EU%20NGS/EU%20RNA-Seq%20GENEWIZ_RNA-Seq_Technical_Specifications_EU.pdf). Own data show that we can isolate 2 micrograms out of 40000 PC12 cells. However, when using primary rat RGCs, there will be cell loss in the first days after isolation, before the experiment can start. Also the glaucoma trigger will induce cell loss. All together, we expect that if we seed maximally 60000 cells, we will have sufficient RNA for RNA seq. In parallel, for each sample we will measure the effects on cell death and morphology using 2 separate coverslips (20000 cells). Per sample we thus require in total 100000 cells (5 eyes) for one experimental condition. Per cell death model, we will use maximally 6 experimental conditions (i.e. max 3 trigger strengths and max 2 time points). To measure these 6 conditions, max 15 pups are required for sample size $N=1$.

We will use one way or two way ANOVA design to analyse the effects. We will use a sample size of max $N=7$, aiming to discover the major molecular mechanisms of each cell death model.

Per cell death trigger we thus need $7 \times 15 = 105$ pups.

For 4 cell death models we require max 420 pups.

WP 3: Develop and test new neuroprotective treatments.

Max 760 pups

To prevent or reverse cell death by the different glaucoma triggers, different drugs / dietary supplements will be tested for the different triggers (e.g. mechanical stress, apoptosis / anastasis). We will test max 2 candidate drug in each glaucoma model. These drugs will be tested using cell death, morphology and gene expression as potential output parameters.

One experiment to test one drug consists of 3 drug concentrations (i.e. two drug concentrations and the blank control), 3 conditions of the trigger (e.g. mechanical stress: 0, 35 and 70 mmHg), one time point (e.g. 24 hrs), 3 coverslips of 20000 cells to measure the output parameters (e.g. cell death measurements, morphology). This means 27 coverslips. We will use max 7 biological replicates with independent RGC isolations. In total, one experiment to test one drug in one glaucoma model would then require max 189 coverslips of 20000 cells, requiring 95 pups.

Testing 8 drugs (2 drugs per trigger) requires max 760 pups.

**WP 4: Study native ocular expression and localization of molecular targets discovered in WP 2
Max 42 animals required: 21 pups and 21 adult rats.**

In order to establish the native ocular expression and localization of glaucoma proteins we will employ the following methods: immunohistochemistry, in situ hybridisation, western blotting and mRNA analysis. In this experiment no statistical testing is needed. We expect to need a sample size of max. N=7 to obtain solid results.

For immunohistochemistry and in situ hybridisation combined, we will use max 7 pups and 7 adult rats to achieve a sample size of N=7. For western blotting we will use two eyes (one rat) for each biological replicate, requiring in total. max 7 pups and max 7 adult rats. In addition, for mRNA expression we will use max 7 pups and 7 adult rats.

In total, for this work package we request 21 pups and 21 adult animals.

Calculation of the total maximum number of animals required in this PV: 1504 rats

- Pups: max 1482

Explanation: Data of max 1411 pups are needed for WP 1, 2, 3 and 4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances we calculate 5% extra animals (71 pups): in total, max 1482 pups are requested.

- Adult Rats: 22

Explanation: Max 21 adult rats are calculated for WP4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances, we calculate 5% extra animals: 1 extra animal.

Choice of gender:

There is no clear gender predilection for primary open angle glaucoma and we will use animals of both sexes.

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:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments.

There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57).

We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model.

The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age.

Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria.

In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (iPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human iPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Reduction:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped.

All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12).

We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful.

It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.
- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).
- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.
- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").

- We will use the mothers more than one time if possible.
- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible.

We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Refinement:

Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently.

We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals.

The choice for our *in vitro* approach, implies that no *in vivo* glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used.

Application of bio-informatics for *in silico* analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test *in silico* potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments.

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".

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

We will apply general anaesthesia for adult animals.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n/a

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The rats are euthanized, without prior experimentation. We will anesthetize the adult animals first by isoflurane. Early postnatal animals will be euthanized without anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Since no treatment is imposed (other than the sacrifice of the animals), adverse effects on animals' welfare are not expected.

Stress may occur in the mothers when pups are taken away. To avoid this, we will try to use local breeding and re-use mothers. We expect that it will be often possible to use only a part of the litter for RGC isolation (see above). This reduces the stress for the mother and the remaining pups can be used for future breeding or other experiments.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

See above

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').

'Mild' : For 100% of the animals since they are euthanized for collection of eye tissue, or, in case of the mothers, if all pups are taken away.

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.

It is necessary to kill the animals in order to collect the eyes.
Euthanasia will be performed conform Annex IV of Directive 2010/63/EU.

Early postnatal rats (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation.
Adult animals will be first anesthetized and then killed by decapitation.
After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.
These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

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

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

Yes

Naam van het project	Het nabootsen van glaucoom in celkweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan
NTS-identificatiecode	NTS-NL-844366 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	glaucoom retinale ganglion cell celkweek oogzenuw blindheid
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren) Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van zintuigorganen (huid, ogen en oren) bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>De oogziekte glaucoom wordt gekenmerkt door schade aan de oogzenuw, hetgeen leidt tot vermindering van het gezichtsvermogen en blindheid. De ziekte komt veel voor en heeft grote impact. Wereldwijd lijden naar schatting 70 miljoen mensen aan deze ziekte waarvan er 7 miljoen blind zijn.</p> <p>Het is nog onduidelijk hoe de ziekte precies ontstaat. Wel zijn een aantal factoren bekend die het risico op het krijgen van glaucoom verhogen. Dit zijn bij voorbeeld hoge leeftijd, erfelijke aanleg, etnische achtergrond en een hoge druk in het oog. Op dit moment bestaat de behandeling uit het geven van oogdruppels en chirurgische ingrepen die als doel hebben om de druk in het oog te verminderen. Helaas kan dit de ziekte vaak niet helemaal stoppen en blijft het gezichtsvermogen achteruitgaan: Aan het eind van het leven is 10% van de glaucoompatiënten blind aan beide ogen, ook in Nederland.</p> <p>Het huidige project zoekt nieuwe behandelmogelijkheden voor glaucoom. De achteruitgang van het gezichtsvermogen is het directe gevolg van het afsterven van de gespecialiseerde zenuwcellen in het oog, die de lichtprikkels van het oog naar de hersenen geleiden. Deze zenuwcellen, de zogenaamde retinale ganglion cellen, kunnen niet vervangen worden als ze verloren gaan. Zo neemt met elke cel die verloren gaat, telkens het gezichtsvermogen een beetje af.</p> <p>Het doel van dit onderzoek is geneesmiddelen en/of voedingssupplementen te ontdekken die deze cellen beter te beschermen. Onze aanpak is als volgt: We isoleren deze gespecialiseerde cellen uit het netvlies van proefdieren, houden deze in het laboratorium in leven en stellen ze bloot aan factoren, waarvan we weten dat ze een rol spelen bij glaucoom. Zo bootsten we bijvoorbeeld de effecten van hoge oogdruk in het laboratorium na. In dit glaucoommodel onderzoeken we dan heel gedetailleerd hoe en waarom de cellen doodgaan en welke behandeling dit kan tegengaan. Het doel is om geneesmiddelen of voedingssupplementen te ontwikkelen die deze cellen en de oogzenuw beschermen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen,	<p>Het project heeft de volgende verwachte opbrengsten:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Kennis van de veranderingen die tijdens glaucoom in de retinale ganglion cellen optreden en die leiden tot het afsterven van deze cellen. Dit is wetenschappelijk van belang. 2) Mogelijke geneesmiddelen of voedingssupplementen die deze cellen en de oogzenuw

dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

beschermen bij glaucoom. Dit vertraagt het verlies aan gezichtsvermogen en kan blindheid uitstellen of voorkomen en is van groot maatschappelijk belang. De kandidaat-geneesmiddelen kunnen vervolgens in klinische trials worden getest.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren worden gedood zonder voorafgaande handelingen ten behoeve van het verkrijgen van de gespecialiseerde oogcellen.</p>				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De dieren worden in het kader van de proef gedood. Dit gebeurt door gekwalificeerd personeel, waardoor pijn en stress minimaal zal zijn. Voorafgaand aan het doden van de dieren wordt geen ongerief verwacht omdat de dieren gefokt, gehuisvest en verzorgd worden door gekwalificeerd personeel onder gecontroleerde en goede omstandigheden. Alle noodzakelijke handelingen worden ook door gekwalificeerd personeel uitgevoerd.</p>				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>		
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>			
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De dieren worden in het kader van de proef gedood. Het doel van de proef is om gespecialiseerde netvliescellen te verkrijgen. Hiervoor is het noodzakelijk de dieren te doden en de ogen uit te nemen.</p>				
	<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>	
	<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>1504</p>	<p>0</p>	<p>1504</p>	<p>0</p>
	<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De onomkeerbare stap in glaucoom is de celdood van de retinale ganglion cellen. Daarom richt het project zich op deze gespecialiseerde netvliescellen. Deze gespecialiseerde cellen kunnen niet lang in het laboratorium in leven gehouden worden (en ze kunnen zich niet vermeerderen) en moeten regelmatig uit proefdieren geïsoleerd worden. Slachtafval voldoet niet als bron voor de cellen omdat het bronweefsel heel vers moet zijn en alle omstandigheden precies gestandaardiseerd moeten zijn om de kweek van deze kwetsbare cellen te doen slagen en de variatie beperkt te houden. Ook humane donorogen kunnen niet vers genoeg verkregen worden voor succesvolle isolatie en kweek van retinale ganglion cellen. Op dit moment is het nog niet mogelijk om goede, volledig ontwikkelde en gerijpte humane retinale ganglion cellen te verkrijgen d.m.v. stamceltechnologie en zijn de retinale ganglion cellen uit proefdieren de standaardcellen voor dit type onderzoek. Er zijn geen onsterfelijk gemaakte cellijnen beschikbaar voor deze gespecialiseerde netvliescellen. Daarom zullen we de uiteindelijke proeven moeten doen met retinale ganglion cellen verkregen uit proefdieren. Wel is het mogelijk om onsterfelijk gemaakte cellijnen te gebruiken om de proeven met de retinale ganglion cellen van ratten zo goed mogelijk voor te bereiden. Op deze manier zullen we het aantal gebruikte proefdieren zo laag mogelijk houden.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Statistische methoden worden gebruikt om het aantal proefdieren zo klein mogelijk te houden. Voor onze experimenten gebruiken we alleen de ogen. De andere weefsels kunnen door andere onderzoekers gebruikt worden. Omgekeerd, kunnen we ook oogweefsel gebruiken van andere dierexperimenten als het aan onze criteria voldoet. Daarnaast maken we gebruik van computers en specifieke computer programma's om zo goed mogelijk te voorspellen welke geneesmiddelen voor ons doel het meest geschikt zijn en om het aantal experimenten waarvoor proefdieren nodig zijn tot het minimum te beperken. In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren. We gebruiken bij voorbeeld "live cell imaging", waarmee levende cellen en de veranderingen die in de cellen in de tijd optreden, bestudeerd worden met microscopie. Daarnaast gebruiken we "RNA-seq", een techniek die in één meting de activiteit van alle genen tegelijkertijd in kaart kan brengen.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen (RNA-seq, computer programma's, live cell imaging) die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren. Door te kiezen voor het nabootsen van glaucoom in celkweek, is geen in vivo glaucoomdiermodel met bijbehorend ongerief nodig. Het verzamelen van pups voor het spenen kan voor de moeders ongemak veroorzaken. We zullen proberen dit ongemak te minimaliseren door lokale kweek te gebruiken en niet het volledige nest te gebruiken, maar slechts een deel van het nest.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We kiezen voor de rat als proefdier om verschillende redenen. Dit proefdier is goed vergelijkbaar met de mens en retinale ganglion cellen van de rat kunnen goed model staan voor de humane netvliescellen. Er is een grote kans dat als een geneesmiddel in de cellen van dit proefdier werkt, dat het dan ook gebruikt kan worden om een therapie voor de mens te ontwikkelen. Bovendien zijn veel kennis, expertise en ook technische hulpmiddelen beschikbaar voor deze diersoort. We zullen jonge, nog ongespeende ratten gebruiken omdat deze leeftijd het beste is om een goede opbrengst aan netvliescellen voor de celweek te verkrijgen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: dinsdag 1 juni 2021 15:22
Aan: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2e
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114405
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 14-01-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114405. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

U voert uw onderzoek uit met pups. Dit blijkt niet uit de NTS. Kunt u de NTS aanpassen zodat vermeld wordt dat in u uw onderzoek gebruik wordt gemaakt van pups.

Onduidelijkheden

In de richtlijn staat dat decapitatie enkel is toegestaan indien niet mogelijk is om een andere dodingsmethode te gebruiken. Kunt u onderbouwen waarom decapitatie noodzakelijk is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag
.....

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 4 juni 2021 13:46
Aan: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
Onderwerp: Telefonische vraag AVD 5.1 lid2h 202114405

Beste IvD,

Zoals begin deze week telefonisch besproken:

- De moederratten waarvan alle pups worden weggehaald zijn niet vergunningplichtig, omdat dit ook bij reguliere fok wel eens voorkomt. Het is wel goed dat u het heeft beschreven in uw vergunningaanvraag, zodat dit wel in de ethische afweging meegenomen kon worden. Zo heeft u het volledige plaatje weergegeven in uw aanvraag.
- Wel zal de NVWA bij eventuele inspecties vragen wat de omstandigheden zijn, waarom de moederdieren zonder pups zitten, en wat u eraan gedaan heeft om dit te voorkomen (denk hierbij bijvoorbeeld aan mogelijkheden tot cross-fostering) en hoe u het welzijn van de dieren zoveel mogelijk geborgd heeft.
- Uiteraard moet individuele huisvesting van de moederdieren voorkomen worden.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

Van: info@zbo-ccd.nl <info@zbo-ccd.nl>
Verzonden: dinsdag 1 juni 2021 15:22
Aan: 5.1 lid2e ; 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114405

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 14-01-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114405. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

U voert uw onderzoek uit met pups. Dit blijkt niet uit de NTS. Kunt u de NTS aanpassen zodat vermeld wordt dat in u uw onderzoek gebruik wordt gemaakt van pups.

Onduidelijkheden

In de richtlijn staat dat decapitatie enkel is toegestaan indien niet mogelijk is om een andere dodingsmethode te gebruiken. Kunt u onderbouwen waarom decapitatie noodzakelijk is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Van: 5.1 lid2e
Verzonden: dinsdag 8 juni 2021 17:40
Aan: 5.1 lid2e); 5.1 lid2h 5.1 lid2e
CC: 5.1 lid2h 5.1 lid2e
Onderwerp: RE: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114405
Bijlagen: PV2020-008_appendix-animal-1 3 Modeling Glaucoma_V7.docx; PV2020-008_NTS_V7.xlsx

Geachte 5.1 lid2e ,

Naar aanleiding van onderstaande email van de Centrale Commissie Dierproeven heb ik de volgende acties ondernomen:

1. Naar aanleiding van het verzoek van de CCD om in de NTS melding te maken van het feit dat we gebruik maken van pups hebben we de tekst van de NTS aangepast. In de NTS in de sectie "Explain the choice of species and the related life stages" hebben we de tekst aangepast in rij 38: We hebben hier de woorden "jonge, nog ongespeende ratten" veranderd in "voornamelijk pups van 4 tot 10 dagen oud".

De gehele zin luidt nu:

"We zullen voornamelijk pups van 4 tot 10 dagen oud gebruiken omdat deze leeftijd het beste is om een goede opbrengst aan netvliescellen voor de celweek te verkrijgen."

2. De CCD verzoekt ook om een onderbouwing dat decapitatie nodig is. Hiervoor hebben we de volgende uitleg gegeven in de appendix bij L:

*It is necessary to kill the animals in order to collect the eyes.
Euthanasia will be performed conform Annex IV of Directive 2010/63/EU.*

*Early postnatal rats (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation without prior anaesthesia.
Adult animals will be first anaesthetized and then killed by decapitation.
After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.
These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.*

*Explanation of the selection of killing method for pups (without anaesthesia) and adult rats (with anaesthesia):
To select the killing method we applied the general principles of minimum pain, suffering and distress and based our choice amongst others on the following documents:
NCad (page 16: killing very young animals):
<https://english.ncadierproevenbeleid.nl/documents/reports/16/9/15/ncad-opinion-on-alternative-killing-methods-for-laboratory-animals>
and the American guidelines for euthanazation (ACLAM, page 99):
<https://www.ingentaconnect.com/contentone/aalas/jaalas/2006/00000045/00000001/art00014?crawler=true&mimetype=application/pdf>*

Two considerations are important for the selection of killing method for the pups:

1. The tissue of the pups is required for isolation of neuronal cells for culturing. In contrast, the tissue of the adult animals is not used for primary cell culture, but is meant for expression studies (e.g. immunohistochemistry).

The pups will be killed, after which eyes are removed for isolation of retinal ganglion cells for primary cell culture. These postmitotic neuronal cells are delicate cells. They will be damaged during excision of the eyes (when their axonal connections to the brain are cut), and will be damaged during the isolation and purification procedure (e.g. by enzymatic digestion and mechanical forces). The resulting primary cell culture is very vulnerable and has a high cell death percentage.

2. The physiology of the neonates differs from that of adult rats, making them, for example, more resistant for hypoxia.

Considering this, we excluded the following killing methods for the pups:

1. CO2/O2 inhalation: For rat pups this method takes a very long time. In addition, the CO2/O2 may have a negative effect on the neuronal cells.

2. Submerging in liquid Nitrogen: This method is incompatible with the isolation of cells for cell culture.

3. Injection with anesthetic overdose. This may affect the neuronal cells.

4. Sedation of pups prior to decapitation:

- Inhalation anesthesia (Isoflurane): This will also take a prolonged time in pups as compared to adults and may have effects on the neuronal cells.*
- Hypothermia: This can be considered for fetuses which have not yet grown fur (NCad, page 16) or pups of 6 days or less (ACLAM, page 99). In our experiments we intend to use pups of postnatal day 7, which have already some fur. In addition, hypothermia may affect the neuronal cells.*

In conclusion, for the pups we selected the method of decapitation without prior anesthesia/sedation, limiting possible negative effects on the neuronal cells, which we intend to purify and culture as a primary culture. In contrast, adult rats, we will first anesthetize and then decapitate. This can be done for the adult animals because we do not use adult tissue for primary cell culture and because the adult physiology allows for a quicker anesthesia.

U vindt bijgesloten de nieuwe versie van de NTS (PV2020-008_NTS_V7) en de nieuwe versie van de bijlage dierproeven (PV2020-008_appendix-animal-1 3 Modeling Glaucoma_V7). De andere documenten van de dierexperimentaanvraag blijven onveranderd en heb ik niet opnieuw bijgesloten.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e

5.1 lid2e

5.1 lid2h

5.1 lid2e

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

Verzonden: dinsdag 1 juni 2021 15:22

Aan: 5.1 lid2e

5.1 lid2h

cc: 5.1 lid2e

; 5.1 lid2h

5.1 lid2h

Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202114405

Geachte **5.1 lid2e** ,

Op 14-01-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" met aanvraagnummer AVD**5.1 lid2h**202114405. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

U voert uw onderzoek uit met pups. Dit blijkt niet uit de NTS. Kunt u de NTS aanpassen zodat vermeld wordt dat in u uw onderzoek gebruik wordt gemaakt van pups.

Onduidelijkheden

In de richtlijn staat dat decapitatie enkel is toegestaan indien niet mogelijk is om een andere dodingsmethode te gebruiken. Kunt u onderbouwen waarom decapitatie noodzakelijk is?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you

are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

This email and any attachments may contain confidential or privileged information and is intended for the addressee only. If you are not the intended recipient, please immediately notify us by email or telephone and delete the original email and attachments without using, disseminating or reproducing its contents to anyone other than the intended recipient. 5.1 lid2h shall not be liable for the incorrect or incomplete transmission of this email or any attachments, nor for unauthorized use by its employees.



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'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

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 the current research project, we focus on retinal ganglion cells (RGCs) since the loss of these specific cells represents the irreversible step in glaucoma pathology. General aim of the research project is to develop new treatments to prevent the loss of RGCs in glaucoma. We will do this by mimicking the RGC cell death of glaucoma *in vitro*, study the disease mechanisms and then develop and test neuroprotective treatments.

In order to model RGC cell death *in vitro*, RGCs are required. In this project, we will employ primary cultures of rat RGCs. (for justification of this choice see below "D, Replacement"). The purpose of the animal procedure described in this appendix is to provide suitable rat RGCs for the glaucoma disease modeling which aims to develop new glaucoma drugs. The primary output parameter of the animal procedure will be the yield of suitable RGCs for the *in vitro* glaucoma models.

General design of the animal procedures:

The rats are euthanized, without prior experimentation. The eyes are taken out and further processed.

Isolation and purification of the RGCs occurs according to established protocols, that are operational in our laboratory. Next, the RGCs are used in experiments aimed at developing neuroprotective drugs and treatments.

In work packages 1- 3 early postnatal animals will be used since at this stage the yield of viable and well differentiated RGCs is optimal (Winzeler and Wang 2014, *Cold Spring Harb Protoc*; 2013; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961).

In work package 4, also adult animals are used in order to verify that the molecular targets identified in the current project are also present in the adult retina.

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

Early postnatal rat pups (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation.

Adult animals will be first anesthetized and then killed.

After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed.

These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

The other organs may be removed and donated to other research projects.

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

As stated in the project proposal form, the animal experiments are needed for 4 different work packages:

1. Set up *in vitro* glaucoma models
2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)
3. Develop and test new neuroprotective treatments
4. Study the ocular expression and localization of molecular targets discovered in 2

To minimize the number of animals required, we first use immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up and optimize all required techniques. Only if a method or technique is successfully set up using PC12 cells, will we continue with rat cells (GO / NO GO criterium).

GO / NO GO criteria: For each glaucoma model progression from WP1 to WP2 only possible when WP1 is successfully completed. Similarly, only after completion of WP2, WP3 can be started. WP4 can be done in parallel with WP3 (also see flow chart in project proposal).

We will use statistical methods to demonstrate significant effects in our experiments. In the scientific literature of this type of experiments (pathology models using primary rodent RGCs cultures), generally parametric statistical tests (Student's T test, one- and two-sided ANOVA, $P < 0.05$) are used. The sample size is the number of biological replicates, i.e. the number of individual RGC isolations, each using a pool of biologically different retina's to isolate RGCs. Each biological replicate contains sufficient RGCs to allow technical replicates of the measurements in order to keep the standard deviation of the measurement low.

Examining the literature we found that the samples size for this kind of experiments generally is 3 to 7. In rare instances, higher samples sizes are used. Since we are interested in large effects, we are confident that a sample size of max 7 will be sufficient for our project.

A good illustration is a recent study in *J Mol Biol*, on lactate-mediated protection in retinal ganglion cells (Vohra et al 2019, *J. Mol Biol.* 143: 1878-1888). In this study, several different types of experiments were done each demonstrating significant effects, each using different samples sizes, ranging from 3 to 7. Therefore, a sample size of max 7 likely is sufficient for these type of experiments to obtain biologically meaningful results. In our experiments (see below) we will therefore, request sufficient rats to achieve a maximum sample size of 7. Yet, this maximum will not always be needed and we will start the experiments with a lower sample size and see whether this is sufficient to significantly demonstrate the biological effect.

We selected those analysis techniques that generate relatively much information from limited use of animals. These techniques are:

- 1) Live, single cell imaging, which requires less cells than many other, cell biology methods.

2) RNA sequencing to comprehensively analyse the molecular mechanisms of RGC cell death.

B. The animals

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

Species: rat, wild type

Choice for rats:

The rat is most widely used for generating primary RGC cultures (pioneering work of dr. Barres: *Barres et al. 1988, Neuron 1: 791-803*) and modelling glaucoma (e.g. *Sappington et al. 2009, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 47: 2932-42*). Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

Origin:

We will obtain the animals from certified suppliers or from local breeding.

Life stage:

Early postnatal rats are used since this stage is optimal for providing cultures of viable, well-differentiated RGCs (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906 and doi:10.1101/pdb.top070961*).

In addition, a limited number of adult animals is required (in work package 4) to determine the localization of expression of proteins, that are found in work package 2 to be important for RGC cell death.

Strategy for breeding and using pups:

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest. We aim to leave at least 2 pups with the mother. Our method of isolation of RGCs requires a minimum of 4 pups (8 retina's) for each isolation, which means that we would like to have at least 6 pups per litter. This generally will be the case (we use the strain Sprague Dawley which has average litter size of 10.5). In addition, we can use more than one breeding pair if we need many pups. Yet, there always is the possibility that there will be less than 6 pups born. If there are less than 4, we cannot and will not perform the experiment. If there are 4 or 5 pups born, we will choose to use the complete nest. This will lead to discomfort to the mother but otherwise would lead to 4 to 5 pups being killed without use.

In addition, we will try to re-use the mothers as much as possible.

Estimated numbers:

The number of animals required was estimated on the basis of our pilot studies and previous published studies in the literature using similar materials, methods and research questions. As indicated above, a maximum sample size of 7 apparently is sufficient for most of these experiments to obtain meaningful results.

Also relevant is the yield of RGCs per rat. Yields of RGCs according to the published protocols (*Winzeler and Wang 2014, Cold Spring Harb Protoc; doi:10.1101/pdb.prot074906*) are 30,000 cells for early postnatal rat retina. In our hands, the yield of RGCs were on average approximately 20000 viable RGCs per retina, which means 40000 RGCs per animal, for use in our experiments.

Calculation of the numbers of animals needed for the experiments:

The rat RGCs are needed for multiple, diverse studies. In the project proposal form we listed the following 4 work packages (WP):

WP 1. Set up in vitro glaucoma models

WP 2. Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

WP 3. Develop and test new neuroprotective treatments

WP 4. Study the native ocular expression and localization of molecular targets discovered in WP 2

WP 1: Set up in vitro glaucoma models

Max 168 pups required

Calculation: We will set up glaucoma *in vitro* models with the following triggers: 1) mechanical stress, 2) mitochondrial dysfunction, 3) ethanol and 4) staurosporine. For each of these models, we will first set up all techniques using a neuronal cell line (e.g. PC12). After that, we will perform experiments with primary RGCs to explore the sensitivity of RGCs for the trigger and select the optimal conditions for the trigger.

To measure the effect of the cell death triggers, we examine cells seeded on coverslips. Each coverslip is seeded with 20000 cells. One coverslip is required for cell death assessment; a second coverslip is used for morphology. Multiple positions on the coverslip will be imaged in order to get a fair estimate of the effect of the trigger. For each glaucoma model, we aim to find the conditions of the experimental parameters that define max. 6 experimental groups, including the control. For example for mechanical stress, we expect to use hydrostatic pressure of 0, 35 and 70 mmHg, with two durations (e.g. 8 hrs and 24 hrs), which means 6 experimental groups. For each group two coverslips are needed for assessment: We need 12 coverslips for one independent experiment, performed with cells from one independent RGC isolation. We will use max seven experiments to set up and establish each disease model.

Calculation:

Each cell death trigger: max. 84 coverslips, each containing 20000 cells. Isolation of RGCs of rats of postnatal day 7 yields 40000 cells per rat. Per trigger 42 pups are required.

In total for 4 triggers: $4 \times 42 = \text{max. } 168$ pups

WP 2: Study the cell death mechanism (molecular and cell biological events)

- WP 2A: Cell biology/live-imaging: max 42 pups

We will study the cell death process in each disease model in detail with live cell imaging using light microscopy and correlative electron microscopy. In these live imaging experiments, single cells are examined (various single cells at several positions in each experiment). Our pilot experiments with PC12 cells have shown that 10000 cells per slide are sufficient to obtain an adequate cell sampling for reliable measurement. In each imaging session, six conditions are imaged (control, plus five experimental conditions for assessing the cell death mechanism). This means that cells of 3 eyes are required for each imaging experiment. We will replicate each imaging experiment max 7 times with independent RGC isolations in order to document the involved cell death program. To study this in four disease models, we require in total 42 pups.

- WP 2B: Molecular biology / biochemistry: max 420 pups

Biochemical experiments (RNAseq) will be done for the cell death triggers (4) and various time points (max 2) and trigger strengths (max 3, including the control).

For RNAseq, 2 microgram of total RNA is recommended per sample by commercial sequencing companies (e.g. https://cdn2.hubspot.net/hubfs/3478602/Campaigns/EU/EU%20NGS/EU%20RNA-Seq%20GENEWIZ_RNA-Seq_Technical_Specifications_EU.pdf). Own data show that we can isolate 2 micrograms out of 40000 PC12 cells. However, when using primary rat RGCs, there will be cell loss in the first days after isolation, before the experiment can start. Also the glaucoma trigger will induce cell loss. All together, we expect that if we seed maximally 60000 cells, we will have sufficient RNA for RNA seq. In parallel, for each sample we will measure the effects on cell death and morphology using 2 separate coverslips (20000 cells). Per sample we thus require in total 100000 cells (5 eyes) for one experimental condition. Per cell death model, we will use maximally 6 experimental conditions (i.e. max 3 trigger strengths and max 2 time points). To measure these 6 conditions, max 15 pups are required for sample size $N=1$.

We will use one way or two way ANOVA design to analyse the effects. We will use a sample size of max $N=7$, aiming to discover the major molecular mechanisms of each cell death model.

Per cell death trigger we thus need $7 \times 15 = 105$ pups.

For 4 cell death models we require max 420 pups.

WP 3: Develop and test new neuroprotective treatments.

Max 760 pups

To prevent or reverse cell death by the different glaucoma triggers, different drugs / dietary supplements will be tested for the different triggers (e.g. mechanical stress, apoptosis / anastasis). We will test max 2 candidate drug in each glaucoma model. These drugs will be tested using cell death, morphology and gene expression as potential output parameters.

One experiment to test one drug consists of 3 drug concentrations (i.e. two drug concentrations and the blank control), 3 conditions of the trigger (e.g. mechanical stress: 0, 35 and 70 mmHg), one time point (e.g. 24 hrs), 3 coverslips of 20000 cells to measure the output parameters (e.g. cell death measurements, morphology). This means 27 coverslips. We will use max 7 biological replicates with independent RGC isolations. In total, one experiment to test one drug in one glaucoma model would then require max 189 coverslips of 20000 cells, requiring 95 pups.

Testing 8 drugs (2 drugs per trigger) requires max 760 pups.

**WP 4: Study native ocular expression and localization of molecular targets discovered in WP 2
Max 42 animals required: 21 pups and 21 adult rats.**

In order to establish the native ocular expression and localization of glaucoma proteins we will employ the following methods: immunohistochemistry, in situ hybridisation, western blotting and mRNA analysis. In this experiment no statistical testing is needed. We expect to need a sample size of max. N=7 to obtain solid results.

For immunohistochemistry and in situ hybridisation combined, we will use max 7 pups and 7 adult rats to achieve a sample size of N=7. For western blotting we will use two eyes (one rat) for each biological replicate, requiring in total. max 7 pups and max 7 adult rats. In addition, for mRNA expression we will use max 7 pups and 7 adult rats.

In total, for this work package we request 21 pups and 21 adult animals.

Calculation of the total maximum number of animals required in this PV: 1504 rats

- Pups: max 1482

Explanation: Data of max 1411 pups are needed for WP 1, 2, 3 and 4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances we calculate 5% extra animals (71 pups): in total, max 1482 pups are requested.

- Adult Rats: 22

Explanation: Max 21 adult rats are calculated for WP4. To account for dropout of data points due to unforeseen circumstances, we calculate 5% extra animals: 1 extra animal.

Choice of gender:

There is no clear gender predilection for primary open angle glaucoma and we will use animals of both sexes.

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:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments.

There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57).

We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model.

The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age.

Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria.

In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (iPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human iPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Reduction:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped.

All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12).

We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful.

It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.
- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).
- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.
- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").

- We will use the mothers more than one time if possible.
- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible.

We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Refinement:

Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently.

We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals.

The choice for our *in vitro* approach, implies that no *in vivo* glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used.

Application of bio-informatics for *in silico* analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test *in silico* potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments.

Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".

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

We will apply general anaesthesia for adult animals.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

n/a

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

The rats are euthanized, without prior experimentation. We will anesthetize the adult animals first by isoflurane. Early postnatal animals will be euthanized without anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Since no treatment is imposed (other than the sacrifice of the animals), adverse effects on animals' welfare are not expected.

Stress may occur in the mothers when pups are taken away. To avoid this, we will try to use local breeding and re-use mothers. We expect that it will be often possible to use only a part of the litter for RGC isolation (see above). This reduces the stress for the mother and the remaining pups can be used for future breeding or other experiments.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

See above

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').

'Mild' : For 100% of the animals since they are euthanized for collection of eye tissue, or, in case of the mothers, if all pups are taken away.

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.

It is necessary to kill the animals in order to collect the eyes.
Euthanasia will be performed conform Annex IV of Directive 2010/63/EU.

Early postnatal rats (postnatal day 4 - 10) will be sacrificed by decapitation without prior anaesthesia. Adult animals will be first anaesthetized and then killed by decapitation. After killing the animals, the eyes will be taken out and further processed. These methods minimize discomfort for the pups and adult animals while providing optimal tissue for culturing and expression studies.

Explanation of the selection of killing method for pups (without anaesthesia) and adult rats (with anaesthesia):

To select the killing method we applied the general principles of minimum pain, suffering and distress and based our choice, amongst others, on the following documents:

NCad (page 16: killing very young animals):

<https://english.ncadierproevenbeleid.nl/documents/reports/16/9/15/ncad-opinion-on-alternative-killing-methods-for-laboratory-animals>

and the American guidelines for euthanazation (ACLAM, page 99):

<https://www.ingentaconnect.com/contentone/aalas/jaalas/2006/00000045/00000001/art00014?crawler=true&mimetype=application/pdf>

Two considerations are important for the selection of killing method for the pups:

1. The tissue of the pups is required for isolation of neuronal cells for culturing. In contrast, the tissue of the adult animals is not used for primary cell culture, but is meant for expression studies (e.g. immunohistochemistry).

The pups will be killed, after which eyes are removed for isolation of retinal ganglion cells for primary cell culture. These postmitotic neuronal cells are delicate cells. They will be damaged during excision of the eyes (when their axonal connections to the brain are cut), and will receive additional damage during the isolation and purification procedure (e.g. by enzymatic digestion and mechanical forces). The resulting primary cell culture is very vulnerable and has a high cell death percentage.

2. The physiology of the neonates differs from that of adult rats, making them, for example, more resistant for hypoxia.

Considering this, we excluded the following killing methods for the pups:

1. CO₂/O₂ inhalation: For rat pups this method takes a very long time. In addition, the CO₂/O₂ may have a negative effect on the neuronal cells.
2. Submerging in liquid Nitrogen: This method is incompatible with the isolation of cells for cell culture.
3. Injection with anesthetic overdose. This may affect the neuronal cells.
4. Sedation of pups prior to decapitation:
 - Inhalation anaesthesia (Isoflurane): This will also take a prolonged time in pups as compared to adults and may have effects on the neuronal cells.

- Hypothermia: This can be considered for foetuses which have not yet grown fur (NCad, page 16) or pups of 6 days or less (ACLAM, page 99). In our experiments, we intend to use pups of postnatal day 7, which have already some fur. In addition, hypothermia may affect the neuronal cells.

In conclusion, for the pups we selected the method of decapitation without prior anesthesia/sedation, limiting possible negative effects on the neuronal cells, which we intend to purify and culture as a primary culture. In contrast, adult rats, we will first anesthetize and then decapitate. This can be done for the adult animals because we do not use adult tissue for primary cell culture and because the adult physiology allows for a quicker anesthesia.

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

Naam van het project	Het nabootsen van glaucoom in celkweek voor onderzoek naar geneeswijzen die glaucoom tegengaan
NTS-identificatiecode	NTS-NL-046480 v.1
Nationale identificatiecode van de NTS <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Land	Nederland
Taal	nl
Indiening bij EU <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	ja
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	glaucoom retinale ganglion cell celkweek oogzenuw blindheid
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren) Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Aandoeningen van zintuigorganen (huid, ogen en oren) bij de mens

DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).	<p>De oogziekte glaucoom wordt gekenmerkt door schade aan de oogzenuw, hetgeen leidt tot vermindering van het gezichtsvermogen en blindheid. De ziekte komt veel voor en heeft grote impact. Wereldwijd lijden naar schatting 70 miljoen mensen aan deze ziekte waarvan er 7 miljoen blind zijn.</p> <p>Het is nog onduidelijk hoe de ziekte precies ontstaat. Wel zijn een aantal factoren bekend die het risico op het krijgen van glaucoom verhogen. Dit zijn bij voorbeeld hoge leeftijd, erfelijke aanleg, etnische achtergrond en een hoge druk in het oog. Op dit moment bestaat de behandeling uit het geven van oogdruppels en chirurgische ingrepen die als doel hebben om de druk in het oog te verminderen. Helaas kan dit de ziekte vaak niet helemaal stoppen en blijft het gezichtsvermogen achteruitgaan: Aan het eind van het leven is 10% van de glaucoompatiënten blind aan beide ogen, ook in Nederland.</p> <p>Het huidige project zoekt nieuwe behandelmogelijkheden voor glaucoom. De achteruitgang van het gezichtsvermogen is het directe gevolg van het afsterven van de gespecialiseerde zenuwcellen in het oog, die de lichtprikkels van het oog naar de hersenen geleiden. Deze zenuwcellen, de zogenaamde retinale ganglion cellen, kunnen niet vervangen worden als ze verloren gaan. Zo neemt met elke cel die verloren gaat, telkens het gezichtsvermogen een beetje af.</p> <p>Het doel van dit onderzoek is geneesmiddelen en/of voedingssupplementen te ontdekken die deze cellen beter te beschermen. Onze aanpak is als volgt: We isoleren deze gespecialiseerde cellen uit het netvlies van proefdieren, houden deze in het laboratorium in leven en stellen ze bloot aan factoren, waarvan we weten dat ze een rol spelen bij glaucoom. Zo bootsten we bijvoorbeeld de effecten van hoge oogdruk in het laboratorium na. In dit glaucoommodel onderzoeken we dan heel gedetailleerd hoe en waarom de cellen doodgaan en welke behandeling dit kan tegengaan. Het doel is om geneesmiddelen of voedingssupplementen te ontwikkelen die deze cellen en de oogzenuw beschermen.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen,	<p>Het project heeft de volgende verwachte opbrengsten:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Kennis van de veranderingen die tijdens glaucoom in de retinale ganglion cellen optreden en die leiden tot het afsterven van deze cellen. Dit is wetenschappelijk van belang. 2) Mogelijke geneesmiddelen of voedingssupplementen die deze cellen en de oogzenuw

dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

beschermen bij glaucoom. Dit vertraagt het verlies aan gezichtsvermogen en kan blindheid uitstellen of voorkomen en is van groot maatschappelijk belang. De kandidaat-geneesmiddelen kunnen vervolgens in klinische trials worden getest.

VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De dieren worden gedood zonder voorafgaande handelingen ten behoeve van het verkrijgen van de gespecialiseerde oogcellen.</p>				
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>De dieren worden in het kader van de proef gedood. Dit gebeurt door gekwalificeerd personeel, waardoor pijn en stress minimaal zal zijn. Voorafgaand aan het doden van de dieren wordt geen ongerief verwacht omdat de dieren gefokt, gehuisvest en verzorgd worden door gekwalificeerd personeel onder gecontroleerde en goede omstandigheden. Alle noodzakelijke handelingen worden ook door gekwalificeerd personeel uitgevoerd.</p>				
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Totaal aantal</p>	<p>Geraamde aantallen naar ernstgraad</p>		
<p>Ratten (Rattus norvegicus)</p>	<p>1504</p>	<p>0</p>	<p>Licht</p> <p>1504</p>	<p>Matig</p> <p>0</p>	<p>Ernstig</p> <p>0</p>
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<p>Soort:</p>	<p>Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</p>			
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Geadopteerd</p>		
<p>De dieren worden in het kader van de proef gedood. Het doel van de proef is om gespecialiseerde netvliescellen te verkrijgen. Hiervoor is het noodzakelijk de dieren te doden en de ogen uit te nemen.</p>					

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

1. Vervanging

Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.

De onomkeerbare stap in glaucoom is de celdood van de retinale ganglion cellen. Daarom richt het project zich op deze gespecialiseerde netvliescellen. Deze gespecialiseerde cellen kunnen niet lang in het laboratorium in leven gehouden worden (en ze kunnen zich niet vermeerderen) en moeten regelmatig uit proefdieren geïsoleerd worden. Slachtafval voldoet niet als bron voor de cellen omdat het bronweefsel heel vers moet zijn en alle omstandigheden precies gestandaardiseerd moeten zijn om de kweek van deze kwetsbare cellen te doen slagen en de variatie beperkt te houden. Ook humane donorogen kunnen niet vers genoeg verkregen worden voor succesvolle isolatie en kweek van retinale ganglion cellen. Op dit moment is het nog niet mogelijk om goede, volledig ontwikkelde en gerijpte humane retinale ganglion cellen te verkrijgen d.m.v. stamceltechnologie en zijn de retinale ganglion cellen uit proefdieren de standaardcellen voor dit type onderzoek. Er zijn geen onsterfelijk gemaakte cellijnen beschikbaar voor deze gespecialiseerde netvliescellen. Daarom zullen we de uiteindelijke proeven moeten doen met retinale ganglion cellen verkregen uit proefdieren. Wel is het mogelijk om onsterfelijk gemaakte cellijnen te gebruiken om de proeven met de retinale ganglion cellen van ratten zo goed mogelijk voor te bereiden. Op deze manier zullen we het aantal gebruikte proefdieren zo laag mogelijk houden.

2. Vermindering

Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.

Statistische methoden worden gebruikt om het aantal proefdieren zo klein mogelijk te houden. Voor onze experimenten gebruiken we alleen de ogen. De andere weefsels kunnen door andere onderzoekers gebruikt worden. Omgekeerd, kunnen we ook oogweefsel gebruiken van andere dierexperimenten als het aan onze criteria voldoet. Daarnaast maken we gebruik van computers en specifieke computer programma's om zo goed mogelijk te voorspellen welke geneesmiddelen voor ons doel het meest geschikt zijn en om het aantal experimenten waarvoor proefdieren nodig zijn tot het minimum te beperken. In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren. We gebruiken bij voorbeeld "live cell imaging", waarmee levende cellen en de veranderingen die in de cellen in de tijd optreden, bestudeerd worden met microscopie. Daarnaast gebruiken we "RNA-seq", een techniek die in één meting de activiteit van alle genen tegelijkertijd in kaart kan brengen.

3. Verfijning

Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.

In onze aanpak hebben we voor technieken gekozen (RNA-seq, computer programma's, live cell imaging) die uit elk dierexperiment zo veel mogelijk informatie opleveren. Door te kiezen voor het nabootsen van glaucoom in celkweek, is geen in vivo glaucoomdiermodel met bijbehorend ongerief nodig. Het verzamelen van pups voor het spenen kan voor de moeders ongemak veroorzaken. We zullen proberen dit ongemak te minimaliseren door lokale kweek te gebruiken en niet het volledige nest te gebruiken, maar slechts een deel van het nest.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We kiezen voor de rat als proefdier om verschillende redenen. Dit proefdier is goed vergelijkbaar met de mens en retinale ganglion cellen van de rat kunnen goed model staan voor de humane netvliescellen. Er is een grote kans dat als een geneesmiddel in de cellen van dit proefdier werkt, dat het dan ook gebruikt kan worden om een therapie voor de mens te ontwikkelen. Bovendien zijn veel kennis, expertise en ook technische hulpmiddelen beschikbaar voor deze diersoort. We zullen voornamelijk pups van 4 tot 10 dagen oud gebruiken omdat deze leeftijd het beste is om een goede opbrengst aan netvliescellen voor de celweek te verkrijgen.

VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
Reden voor de beoordeling achteraf	
Bevat ernstige procedures	
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

AANVULLENDE VELDEN

Nationaal veld 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 4 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Nationaal veld 5 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Startdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Einddatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Goedkeuringsdatum project <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 1 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 2 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
ICD-code 3 <i>Veld wordt niet gepubliceerd.</i>	
Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	



Advies aan CCD

Datum 17 juni 2021
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202114405

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies
 Aanvraagnummer: AVD202114405
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

1 Inzicht in aanvraag en de eventuele knelpunten en risico's

<p>Proces</p>	<p>Er zijn geen vragen gesteld aan de DEC.</p> <p>De volgende vragen zijn aan de aanvrager gesteld:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Kunt u onderbouwen of u beide geslachten pups en volwassen dieren in uw onderzoek gebruikt? Kunt u deze informatie ook aanvullen in de bijlage dierproeven? - U heeft de foster moeders in de bijlage opgeteld bij de aantallen dieren. Deze dieren zijn echter niet vergunningplichtig. Kunt u deze 14 dieren weghalen en de aantallen in de bijlage kloppend maken? Kunt u zorgen dat de aantallen in de NTS consistent zijn met de aantallen in de projectaanvraag? <p>Vragen over de NTS:</p> <ul style="list-style-type: none"> - De NTS bevat technisch taalgebruik (bijvoorbeeld moleculaire processen, gedifferentieerde en euthanaseren) waardoor deze niet goed navolgbaar is voor het algemeen publiek. Wij verzoeken u om de technische termen in de NTS te vervangen door meer gangbaar taalgebruik of deze toe te lichten. - U spreekt in de NTS bij what procedures are typically used, en de expected harms over het euthanaseren van de dieren. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u euthanaseren veranderen in doden?
----------------------	---

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Sprague Dawley	1.504	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research

Ratten (*Rattus norvegicus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Er worden voornamelijk jonge ratten (postnatal dag 4 - 10) gebruikt en een beperkt aantal volwassen dieren.

Er is voor deze diersoort gekozen, omdat Citaat:

Rat retinal ganglion cells closely resemble their human counterparts in genetic, molecular and electrophysiological make up and therefore are a good model to study RGC cell death in glaucoma-like conditions.

De pups worden gedood door middel van decapitatie.

Locatie uitvoering experimenten	- Alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat vraag 1 DEC:</p> <p>Het doel van dit project is helder. Echter, de noodzaak voor het gebruik van dieren is dat minder. Recent werk laat zien dat men RGCs kan verkrijgen vanuit iPSCs, zie bijvoorbeeld Ji & Tang (2019) en Rabesandratana et al. (2020), maar ook eerder werk bijvoorbeeld Gill et al. (2014), doi: https://doi.org/10.1167/tvst.3.4.2 en Ohlemacher et al. (2016), https://doi.org/10.1002/stem.2356). De 5.1 lid2h vraagt zich af waarom een dergelijke opzet niet wordt gehanteerd? Zo bespaart men dieren en onderzoekt men de betreffende processen direct in humaan weefsel.</p> <p>Citaat antwoord 1 aanvrager:</p> <p>Zoals hierboven vermeld is ons doel om uiteindelijk met humane retinale ganglioncellen te werken, meer in het bijzonder om de RGCs van de patiënten. We zetten de differentiatie van humane RGCs uit iPSCs op. We beschikken over een analist en een postdoc voor dit project en werken we ook met anderen (PhDs) hieraan. Net als andere laboratoria zoals u hierboven vermeldt, zijn wij nu in staat om uit iPSCs retinaal weefsel te laten differentiëren. In dit weefsel komen ook RGCs tot ontwikkeling getuige de expressie van eiwitten die kenmerkend zijn voor jonge retinale</p>
-------------------	--

ganglion cellen. Markers van rijpe RGCs (zoals RBPMS) komen nog niet tot expressie. Ook is het nog niet mogelijk om uit dit weefsel de hRGCs te isoleren. De manier zoals we RGCs uit ratten retina's zuiveren, maakt gebruik van het oppervlakte eiwit Thy1. Dit is kennelijk nog niet op de humane RGCs tot expressie gebracht want de isolatie lukt niet. Het is duidelijk dat de rijpheid en de zuivering van hRGCs op dit moment nog veel te wensen overlaten. Ook in de literatuur is hier nog geen goede oplossing voor beschreven. Het is niet bekend hoelang het zal duren voordat de humane RGCs een rijpheid hebben zoals de ratten RGCs. Het is wel duidelijk dat op dit moment de ratten RGCs nog de bench mark vormen.

We hebben in de "Background" de volgende tekst toegevoegd: This PV is part of a larger research plan of our institute to enable personalized medicine for glaucoma patients. In order to achieve this we have established an eye tissue bank, in which patient biomaterial and clinical data of our patients are collected and stored. The biomaterial can provide patient iPSCs. We have started a research project (Postdoc, PhD and technician) to generate RGCs from these iPSCs. At this moment we are able to make retinal organoids in which RGCs develop as judged from staining with early RGC markers (e.g. ISLET1). Yet, they have not matured sufficiently (e.g. no staining with RBPMS). In addition, it is not possible yet to isolate RGCs from these organoids. The protocols for isolation and purification of RGCs from the rat retina employ the surface protein Thy1. In the human organoid cultures apparently this protein has not been expressed sufficiently to enable its use for isolation and purification of human RGCs. At this moment, there is no good protocol available to generate mature and relatively pure hRGCs cultures. For now, rodent RGCs are still required and regarded as bench mark.

Citaat vraag 14 DEC:

Aansluitend bij vraag 1, vraagt de [5.1 lid2h](#) verder op te helderen waarom iPSCs niet gebruikt kunnen worden voor dit onderzoek.

Citaat antwoord 14 aanvrager:

Zoals ook hierboven aangegeven (ons antwoord bij 3.1 Achtergrond), gelden hiervoor de volgende redenen:

- (i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.
- (ii) Mede hierdoor (c.q. expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.
- (iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane

RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoomodellen.

Citaat C11.

De **5.1 lid2h** acht het ongerief, mild ongerief bij 100% realistisch ingeschat, zoals nader gepreciseerd in bijlage 1 sectie K. Waar in de **5.1 lid2h** discussie over was is de inclusie van 14 moederdieren die (mild) ongerief zouden ondervinden door het wegnemen van alle pups vóór speenleeftijd. Naar beste weten van de DEC-leden valt dit onder fok, en fok is geen dierproef.

Citaat C14.

Dit punt is uitgebreid besproken en de onderzoekers zijn hierop ook nog bevraagd. In hun antwoord konden zij goed onderbouwen dat er op dit moment nog geen bruikbaar alternatief is waarmee de doelstellingen van de proef behaald kunnen worden. Geschikte cellijnen (of stamcellen) ontbreken. Het project (onder background) is verder verduidelijkt op dit punt. De motivatie bestaat uit 3 punten:

(i) Humane RGCs verkregen uit iPSCs vertonen nog niet de geschikte ontwikkeling en rijping.

(ii) Mede hierdoor (cq expressie van het oppervlakte eiwit CD90, Thy1) zijn isolatie en zuivering van deze humane RGCs nog niet goed mogelijk.

(iii) Het huidige standaard celtype voor dit werk is de ratten RGC. Het is te verwachten dat in de nabije toekomst de resultaten van de studies met ratten RGCs en met humane RGCs vergeleken zullen worden en er zal op een gegeven moment een kantelpunt bereikt worden waarna humane RGCs de eerste keuze zullen gaan worden voor toepassing in de glaucoomodellen.

Punt (i) van de aangevulde motivatie werd nog even betwijfeld door één van de DEC-leden, maar op basis van een schriftelijke ronde onder de DEC-leden is de consensus toch dat de argumenten van de onderzoeker overtuigend zijn. Zij werken zelf mee aan een kantelpunt in dit onderzoek richting gebruik van humane cellen en dan ook naar een afbouw van proefdieren, maar de **5.1 lid2h** is overtuigd dat het kantelpunt op dit moment nog niet helemaal bereikt is, en dus zijn voorlopig ook nog de 'oude' testen op primaire cellen afkomstig van ratten nodig.

Ethische afweging van de DEC:

1. Weegt in het voorgestelde onderzoek naar het nabootsen van glaucoom in gekweekte retinale ganglioncellen middels fysiologische glaucoombevorderaars en celdoodbevorderende stoffen, en de mogelijke remmende werking van medicatie en voedingssupplementen op het celdoodmechanisme in glaucoom, op tegen de opoffering, het ongerief, en de aantasting van de integriteit dat de dieren (ratten) wordt

aangedaan?

2. o Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: licht nadeel.

o Waarden die voor de onderzoekers en wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de medische wetenschap bevorderd worden: substantieel voordeel.

o Waarden die voor de glaucoom patiënt bevorderd worden: reëel voordeel.

De ratten ondergaan slechts zeer beperkt ongerief gedurende hun leven, omdat ze niet onderworpen worden aan experimentele interventies. De enige interventie is het doden (pups en volwassen ratten) en verdoven voor doden (volwassen ratten). De aantasting van de integriteit van de ratten is beperkt voor de pups tot het niet kunnen leiden van een natuurlijke levensloop inclusief soortspecifieke gedragingen, en voor zowel pups als volwassen ratten het gedood worden. De onderzoekers geven aan dat wereldwijd 70 miljoen mensen leiden aan glaucoma, waarbij 10% uiteindelijk blind wordt. In Nederland gaat het om 162.500 mensen met glaucoma. De 5.1 lid2h is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en van personen met glaucoom zwaarder weegt dan de belangen/waarden van de proefdieren.

3. De 5.1 lid2h beantwoordt de centrale morele vraag (zie hierboven punt 1.) bevestigend. De 5.1 lid2h heeft verschillende vragen gesteld over het voorstel, zie hieronder in bijlage I. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verder ontwikkelen van een model om de mechanistische oorzaak van glaucoom te onderzoeken en deze kennis vervolgens te gebruiken voor de ontwikkeling van therapieën. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen en te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen. Op grond van deze overwegingen beschouwt de 5.1 lid2h de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Modelling glaucoma in cell culture to develop new therapies" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de 5.1 lid2h dit projectvoorstel van een positief advies.

De DEC heeft extern advies ingewonnen bij

	<p>- de aanvrager is om aanvullingen gevraagd Er zijn vragen gesteld over de achtergrond, doel, bijlage 1 en de onderzoeksstrategieën.</p> <p>Het DEC advies is Positief</p> <p>Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus. Citaat: Het uitgebrachte 5.1 lid2h advies betreft een meerderheidsstandpunt. Eén lid nam een minderheidsstandpunt in. De argumentatie hierbij was dat de aanvraag niet lijkt te voldoen aan de 'V' van Vervanging. Volgens de nieuwste inzichten en technieken kunnen mature RCGs (blijkens bijvoorbeeld BRN3A and RBPMs expressie) ook verkregen worden uit hIPSCs, middels THY1 (Rabesandratana et al., 2020). Gezien het startpunt van de intrinsieke waarde van het dier, vervalt overeenkomstig dit minderheidsstandpunt de noodzaak tot het gebruik van ratten RCGs ex vivo.</p>
--	---

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies	
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. Ook heeft u aandacht besteed aan punten die volgens u aandacht behoeven. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p>	

4 Inhoudelijke beoordeling

Belangen-verstrengeling	<p>5.1 lid2e </p>
--------------------------------	--

<p>Doelstelling Doelstelling</p>	<p>Citaat: General aim of the research program is to develop treatments (e.g. drugs, dietary supplements) that prevent loss of RGCs in glaucoma. Currently, no neuroprotective drugs are clinically available to treat glaucoma. In the present project, we set up in vitro models with rodent RGCs using several glaucoma triggers. These models will be used to study the mechanism(s) of glaucoma pathology in these cells. In addition, these models can be used to develop and test possible treatments and drugs. This objective is achievable because rodent RGCs can be isolated, cultured in vitro and exposed to cell death triggers, thus modelling glaucoma. This has been done in other labs, e.g. by mimicking the effects of high IOP in vitro, and these techniques are now also operational in our lab. The mechanism of RGC death can be studied with well-known techniques, such as gene expression profiling and live cell microscopic imaging. These techniques are operational in our laboratory and within our professional network. In the in vitro glaucoma models, neuroprotective agents can be developed and tested. Rodent RGCs are often used with this purpose (e.g. Welsbie et al. 2013 PNAS 110: 4045-50). If these agents (drugs, dietary supplements) are effective in the in vitro models, clinical trials can be initiated to bring the treatments to the patients.</p>
<p>Wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Citaat: 1. This project will identify mechanisms of RGC death in a model of glaucoma. This is scientifically of interest for our understanding of glaucoma and for our understanding of survival of neurons in general. Since glaucoma is a multifactorial, heterogeneous disorder, we will study the effects of several glaucoma risk factors and triggers in order to be relevant for a wide range of glaucoma patients. 2. We will study whether the cell death program, once activated, can be stopped and reversed in RGCs (and neurons in general). This reversal of cell death, called anastasis, has been demonstrated for other cell types but not yet for neurons of the central nervous system. 3. We will develop new drugs / dietary supplements for protecting the RGCs (and the optic nerve) of glaucoma patients. In the Netherlands, estimates indicate that 162.500 people have glaucoma. Worldwide, glaucoma affects 70 million people and causes blindness of 7 million people. No cure is available. The only treatment modality is to lower the IOP. Yet, this treatment often does not suffice. End-of-life blindness still amounts to 10% of patients, also in the Netherlands.</p>
<p>Onderbouwing wetenschappelijk en maatschappelijk belang</p>	<p>Het belang is voldoende uitgewerkt en onderbouwd.</p>

<p>Wetenschappelijke kwaliteit Kwaliteit aanvrager/ onderzoeksgroep en onderzoek</p>	<p>Citaat DEC advies C7'. Voor zover de 5.1 lid2h kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep volop aanwezig gezien de jarenlange ervaring met RGC-modellen. Het werk is een logische voortzetting van een eerder project 5.1 lid2h waarin de techniek van RGC isolatie en in vitro-kweek werd opgezet, gevolgd door ontwikkeling van ingrepen die het glaucoomproces nabootsen. Er wordt ook helder beschreven hoe het werkveld zich wereldwijd ontwikkelt en dat dit project in de frontlinie van het glaucoom-onderzoek staat.</p> <p>Het Secretariaat heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van de aanvragers en het onderzoek.</p>
---	--

3V's

Vervanging

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

Glaucoma is caused by the highly specific cell death of one neuronal cell type, the retinal ganglion cell. Therefore, it is important to use this cell type for our experiments. There is currently no immortalized cell line that is accepted for use as model for the retinal ganglion cell. Until recently, the cell line RGC-5 appeared to be a rat RGC cell line, but genetic analysis revealed that this was wrong. It turned out to be a mouse cell line, resembling rather photoreceptor cells than RGCs (Krishnamoorthy et al. 2013 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 54: 5712-9.). There are neuronal cell lines and we will use them, such as PC12 and SH-SY5Y. Yet, there are many differences between cell lines and with primary rat RGCs. For example, see the report of clear differences between various cell lines when studying the glaucoma trigger glutamate toxicity (Kritis et al. 2015, Front. Cell. Neurosci. 9:91). When applied in rat RGCs again a different effect is found (Ullian et al 2004, Mol. Cell. Neurosci. 26: 544-57). We will use neuronal cell lines (e.g. PC12) to set up all required techniques. After that, however, the experiments should be performed with RGCs in order for the experiments to be relevant for glaucoma. At this moment, the rat RGCs are still the bench mark model. The retinal ganglion cells are postmitotic and very vulnerable, since isolation involves disruption of the connections that these cells have formed with cells in the retina as well as with target cells in the brain. The optimal age for obtaining viable, functional RGCs of the rat is known and this is postnatal day 7 (within limits of a few days). It is practically not feasible to isolate human retinal ganglion cells because of lack of supply of fresh post-mortem eye tissue of the right age to provide the viable RGCs. In addition, the whole procedure needs to be standardized in detail to obtain a consistent quality of these vulnerable neurons. It requires fresh material of the optimal, standardized age. Waste tissue from the abattoir also does not meet these criteria. In addition, at this moment it is not possible to obtain well-differentiated human RGCs from differentiation of human embryonic stem cells or human induced pluripotent stem cells (IPSCs), despite recent advances. In order to create this possibility in the near future, we started a research project (with a Postdoc, PhD and technician) of generating human retinal organoids from human ES and human IPSCs. As soon as hRGCs generated this way can be isolated and are well differentiated and suitable for our models, we will use them and replace the rat RGCs. However, for now, rat RGCs are still required and regarded as bench mark.

Verminderen

3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat:

We have a phased design with GO NO GO criteria which ensures that no unnecessary animal experiments will be done. If a NO GO criterium is encountered, the respective line of animal experiments will be stopped. All experiments that we will perform on rat RGCs, will first be prepared, optimizing all parameters, using immortalized neuronal cell lines (e.g. PC12). We will only use the full requested sample size of N=7 if statistical analysis of initial experiments with a lower sample number indicate that this is meaningful. It is possible to combine the use of animals:

- Since we have several (PhD) projects running in parallel we can use one RGC isolation for several experiments.

- When possible and available we will use eyes from animals that are sacrificed for other purposes (if they meet our criteria).

- We only use the eyes, and other organs may be used by other researchers.

- Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers.

We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using only part of the nest (see above: "strategy for breeding and using pups").

- We will use the mothers more than one time if possible.

- For the eyes of adult rats in WP4, the parental rats of the pups in the other experiments can be used.

We will use advanced techniques such as RNAseq and live cell imaging and correlative electron microscopy in order to obtain as much information from a single animal experiment as possible. We collaborate (inter)nationally which will reduce and refine the animal experiments

Verfijnen	
	<p>3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research: Citaat: Rodent RGCs closely resemble their human counterparts in genetic and molecular make up and therefore are a good and often used model to study biochemical changes upon glaucoma-like conditions. Drugs that can block glaucoma pathology in rodent cells likely are valuable for developing new therapies for glaucoma patients. In addition, for rodents much knowledge, expertise, and many tools are available which ensures that research can proceed efficiently. We will use single cell live imaging in order to obtain much information from the available cells. In addition, we will use whole genome gene expression technology that measures expression of all genes simultaneously in one experiment. This approach ensures an optimal use of the animals. The choice for our in vitro approach, implies that no in vivo glaucoma animal model with high level of discomfort, will be used. Application of bio-informatics for in silico analysis of the glaucoma pathways and potential interventions, will allow us to select and test in silico potential drugs. This will refine and reduce the number of animal experiments. Collecting pups before weaning can cause discomfort for the mothers. We will try to minimize this discomfort by using local breeding and using not the full nest but only part of the nest. We defined a strategy for this: See above: "strategy for breeding and using pups".</p>

Hergebruik	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research	HEP: Worden niet verwacht	
Ratten (Rattus norvegicus)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting

5.2 lid1

Het advies van de DEC is tot stand gekomen met een meerderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of er wordt voldaan aan de V van vervanging in deze projectaanvraag. 5.2 lid1

Dit projectvoorstel is een vervolg op AVD5.1 lid2h waarbij het doel was om primaire celweek te optimaliseren en het opzetten van een in vitro model voor glaucoma.

De pups worden gedood door middel van decapitatie. Deze manier van doden van pup is een voor de NVWA geaccepteerde methode.

De aanvrager heeft de moederdieren meegerekend in het projectvoorstel, deze zijn echter niet vergunningsplichtig. Hierdoor vervalt het hergebruik en zullen er 14 dieren minder in aantal op de vergunning komen. De aanvrager is gevraagd om de stukken aan te passen. De aanvrager is gevraagd om te onderbouwen of beide geslachten worden gebruikt.

Er zijn vragen gesteld over de NTS. De aanvrager is verzocht om de terminologie te vereenvoudigen en verhullend taalgebruik aan te passen.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

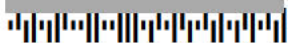
De ingangsdatum van de vergunning kan niet voor de verzenddatum van de beschikking zijn en zal indien van toepassing aangepast worden. Dit is ook het geval bij een voorgenomen besluit.

7 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h
5.1 lid2e
5.1 lid2h



**Centrale Commissie
Dierproeven**
Postbus 93118
2509 AC Den Haag
centralecommissiedierproeven.nl
0900 28 000 28 (10 ct/min)
info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD 5.1 lid2h 202114405
Bijlagen
3

Datum 17 juni 2021
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 14 januari 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114405. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 17 juni 2021 tot en met 1 maart 2026.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

Procedure

Advies dierexperimentencommissie


Wij hebben advies gevraagd bij 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 4 mei 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 12 mei 2021 en 1 juni 2021 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting, het onderbouwen van de geslachten, aanpassen van de moederdieren in de vergunning en het onderbouwen van decapitatie als dodingsmethode. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

17 juni 2021

Aanvraagnummer:AVD  0202114405**Overwegingen**

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

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 vergunninghouder valt.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl, stuur een e-mail naar info@zbo-ccd.nl of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Datum:

17 juni 2021

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 202114405

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

i.o.

5.1 lid2h

drs. F. Braunstahl
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 juni 2021 tot en met 1 maart 2026, voor het project "Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202114405, na advies van 5.1 lid2h . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e

. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 14 januari 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 4 mei 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research, zoals ontvangen op 17 juni 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 17 juni 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 4 mei 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 28 mei 2021, 17 juni 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
3.4.4.1 Euthanization of rats for isolation of eyes for glaucoma research			
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Sprague Dawley	1.504	100,0% Licht

Geldende voorschriften

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202114405

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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

Aanvraagnummer:AVD 5.1 lid 2f 202114405

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

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: woensdag 23 juni 2021 13:58
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202114405
Categorieën: Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2h

Op 14-01-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Modeling glaucoma in cell culture to develop new therapies' met aanvraagnummer AV 5.1 lid2h 202114405.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting, het onderbouwen van de geslachten, aanpassen van de moederdieren in de vergunning en het onderbouwen van decapitatie als dodingsmethode.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 17-6-2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u over het algemeen een heldere onderbouwing. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden. Ook heeft u aandacht besteed aan punten die volgens u aandacht behoeven. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

Bij punt 2 van de ethische afweging geeft u het volgende aan? Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: licht nadeel?. De dieren worden gedood en daarmee wordt in de ogen van de CCD de intrinsieke waarde van de dieren ernstig geschaad. Wellicht refereert u naar het ongerief, maar ten aanzien van de waarden, die voor de proefdieren in het geding zijn kan dat niet zo gesteld worden.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl