

Inventaris Wob-verzoek W23-03		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 202115276	reeds 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	Aanvraag projectvergunning, d.d. 30-07-2021				x		x			
2	Projectvoorstel bij aanvraag				x				x	
3	Bijlage dierproeven bij aanvraag				x				x	
4	NTS bij aanvraag			x						
5	E-mail CCD aan DEC verzoek om advies, d.d. 09-08-2021				x				x	
6	DEC-advies, d.d. 20-9-2021				x				x	
7	Projectvoorstel na DEC advies				x				x	
8	Bijlage dierproeven na DEC advies				x				x	
9	NTS na DEC advies			x						
10	Adviesnota aan CCD, d.d. 22-09-2021 met opmerkingen				x		x		x	x
11	Adviesnota aan CCD, d.d. 23-09-2021 met opmerkingen				x		x		x	x
12	Adviesnota aan CCD, d.d. 24-09-2021				x		x		x	x
13	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvergunning, d.d. 23-09-2021				x		x		x	
14	Reactie op vragen CCD				x		x		x	
15	Bijlage dierproeven na CCD vragen				x				x	
16	NTS na CCD vragen			x						
17	E-mail CCD aan vergunninghouder over aanvraag projectvergunning, d.d. 5-10-2021				x		x		x	
18	Projectvoorstel aangepast na CCD vragen				x				x	
19	Bijlage dierproeven na CCD vragen				x				x	
20	NTS aangepast na CCD vragen en definitieve versie			x						
21	Adviesnota aan CCD, d.d. 15-10-2021				x		x		x	x
22	Adviesnota aan CCD, d.d. 25-10-2021				x		x		x	x
23	Beschikking concept d.d. 25-10-2021				x		x		x	
24	Beschikking definitief d.d. 26-10-2021				x		x		x	
25	E-mail CCD aan DEC, terugkoppeling over projectvergunning, d.d. 22-11-2021				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.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
 - Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	5.1 lid2h
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde KvK-nummer	5.1 lid2h 5.1 lid2e 5.1 lid2h
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.	Straat en huisnummer Postbus Postcode en plaats Iban Tenaamstelling van het rekeningnummer	5.1 lid2h
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e onderzoeker 5.1 lid2e 5.1 lid2e [] Dhr. [x] Mw.
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) naam en voorletters Functie Afdeling Telefoonnummer Email adres	5.1 lid2e onderzoeker 5.1 lid2e 5.1 lid2e [] Dhr. [x] Mw.
1.6	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon	(Titel) naam en voorletters	[] Dhr. [] Mw.

die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
 Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
 Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en Startdatum
einddatum van het project?
1-6-2021
31-5-2026
- 3.2 Wat is de titel van het project?
Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
Valideren en optimaliseren van organoiden ter vervanging van metingen aan levende varkens

3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC Postadres E-mailadres	5.1 lid2h
-----	--	--------------------------------------	-----------

4 Betaalgegevens

4.1	Om welk type aanvraag gaat het?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning €	1.397,-
4.2	Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen. Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.	<input type="checkbox"/> Wijziging € <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso <input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur	

5 Checklist bijlagen

5.1	Welke bijlagen stuurt u mee?	Verplicht <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
		Overige bijlagen, indien van toepassing <input type="checkbox"/> Melding Machtiging <input checked="" type="checkbox"/> inkooporder: 5.1 lid2h

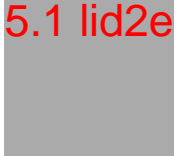
6 Ondertekening

6.1	Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:	Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart: <ul style="list-style-type: none"> • 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.
-----	--	---

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.

• dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld **5.1 lid2e**

Naam	5.1 lid2e	
Functie	gemandateerd vergunni	
Plaats	5.1 lid2h	
Datum	30-7-2021	
Handtekening		

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

5.1 lid2h

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

5.1 lid2h

1.3 List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

Serial number	Type of animal procedure
1	Appendix-1 Study effect of animal age on organoid models_tissues collected after sacrificing pigs

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.

Phenotyping is important in animal breeding and nutrition research. However, complex phenotypes like feed efficiency and intestinal functionality are difficult to measure and the biological mechanisms underlying these phenotypes are often unclear. In this project we aim to use organoids as a phenotyping tool to understand in vivo phenotypes. The ultimate goal is to develop a tool that is applicable in commercial situations. Therefore, commercial pigs will be used. The primary parameter of this project is biological knowledge to apply organoids in livestock and veterinary research. In animal research, age of the animal is an important factor that can have an effect on the results. For organoids, no studies have been done to investigate the effect of animal's age on the produced organoids. We hypothesise that there is no effect of age, which will be beneficial for the reduction of animal experiments needed. When there is no effect of animal's age, tissue can be collected from slaughterhouse that may act as a proxy for young animals tissue types. Particularly in young animals, early life is comprised of several critical phases when the animal experience transitions that can negatively impact productivity. Thus for livestock and veterinary researchers the young animals are of great interest where they conduct research to find solutions that provide support the animal to pass through the transition phase smoothly ensuring no negative impact on productivity. The experiment described in this Appendix 1 aims to study the effect of age of an animal when collecting tissue samples on 1) the adequacy of the in vitro organoid models grown from tissue collected at different ages to represent in vivo functionality, 2) the functionality and gene expression of the organoid model system, and 3) the ease of growing organoids of tissue samples collected at different ages. Tissue samples from the intestine, liver and respiratory tract will be collected at 3 different ages by sacrificing piglets. Tissue samples will be collected at 1 week, 4 weeks (weaning), and 11 weeks (transport) of age. The reason for these ages is the possible change in intestinal functionality due to differences in animal husbandry practices in particular to feeding or housing. At 4 weeks the pigs will be weaned. At 11 weeks the piglets are often being transported to other farms and further considered immunologically more mature. From the tissue samples, organoids will be generated. Organoid cultures will be compared using histology and RNA-seq analysis. Organoids and gene expression data of the piglets will be compared with organoids and gene expression data generated from tissue collected from pigs slaughtered at a slaughterhouse. Standard measurements at the commercial experimental pig facility will be collected: Individual body weight at birth, weaning, 9 days after weaning, ~13 weeks of age, ~18 weeks of age, ~26 weeks of age, feed intake per pen and (if available) individual feed intake, to relate in vitro functionality with in vivo functionality.

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

Pigs born at a commercial experimental pig facility will be used, to have a good reflection of the commercial situation. Pigs will be housed in pens at the same facility, to prevent stress due to transport. According to the commercial standards, individual body weight at different ages will be collected using an electronic weighing scale. Pigs will be fed ad libitum. At 1 week, 4 weeks and 11 weeks of age, pigs will be sacrificed. The procedure will be executed by a specialized veterinarian according to "SOPS-00-28-1066 euthanaseren proefdieren". After sacrificing the piglets, tissue samples from the intestine, liver and respiratory tract and digesta samples will be collected.

Proposed animal procedures:

- Handling pigs to collect individual body weight
- Sacrificing pigs

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

Researchers have used transcriptomics as a read out to measure the effect of their treatment derived from pig intestinal organoids using at least 7 animals (Khalil et al., 2016; Zhu et al., 2020). In our proposal we intend to use transcriptomics as a read out to ascertain the age effect and to link in vitro functionality with in vivo functionality. As of now we could not find any published literature who have estimated the number of pigs needed to find differences between organoids and the read-out of organoids. We believe 10 pigs per age group will be sufficient to capture the differences due to the age group at the level of transcriptomics. The performed power analyses is as follows: When we have 10 biological organoids per age group, significance level of 0.05, and a power of 80%, we can identify a difference between the groups of 1.16. As our primary read-out is gene expression we expect these numbers will be sufficient to investigate the effect of age.

References

Khalil et al., 2016. A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. Cell and tissue research 365: 123-134

Zhu et al., 2020. L-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. Food Function 11: 2714

B. The animals

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

Species: Pigs

Origin: Commercial pigs

Life stages: 1, 4 and 11 weeks of age

Number: 30

Gender: Male

Genetically alerted: No

Strain: Not relevant

Justification for the choice for:

Animal species: The aim of this study is to develop methods for producing organoids as an in vitro model from tissues of pigs. Therefore, pigs will be used in this study.

Origin: Conventional pigs (*Sus scrofa*) from a common breed in the Dutch sector are the target animals for this experiment. Piglets will originate from the same sire and dam line and will be housed at a commercial/experimental pig facility. Pigs used in this experiment will be (familial) related.

Life stages: Tissue samples will be collected at 1 week, 4 weeks, and 11 weeks of age. The reason for these ages is the possible change in intestinal functionality due to differences in animal husbandry practices in particular to feeding or housing. At 4 weeks the pigs will be weaned. At 11 weeks the piglets are often being transported to other farms and further considered immunologically more mature.

Number: In total, 30 pigs will be sacrificed. Sacrificing pigs will take place at 1 week (n=10), 4 weeks (n=10) and 11 weeks (n=10) of age

Gender: Only males will be used, because it is unknown if there is an effect of gender on the produced organoids

Genetic alterations: No

Strain: Not relevant

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'?

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

The overall aim is to develop and validate methods to produce and use organoids as an in vitro model for livestock and veterinary research. The experiment described in Appendix 1 will be used to investigate the effect of animal's age of collecting tissue samples on the organoid model system. As the objective is to produce organoids from tissues from the target animals to serve as future in vitro model, animal-free replacement is not possible.

Reduction:

In this project, research questions from different projects will be combined to study the use of organoids derived from pigs. Tissue samples of different organs (intestines, liver and respiratory tract) will be collected from the same animal, to reduce the number of animals needed. The number of animals has been estimated based on power calculations and on previous knowledge using organoids to study differences between animals. To reduce stress, only standard commercial measurements will be conducted. Furthermore, pigs will stay and sacrificed at the commercial experimental facility, to prevent any transport stress. Enabling the tissue samples and organoids cryopreserved in the proposed biorepository will aid in reducing use of animals in experiments for future research.

Refinement:

Pigs will be sacrificed before collecting tissue samples. The procedure will be executed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to reduce stress. Pigs will be moved to a separate room where they will be euthanized and tissue samples will be collected. Tissue samples should be collected within 1 hour after slaughter. Therefore, one pig at a time will be sacrificed to prevent unusable tissue samples.

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

Animals will be kept in groups, and will be handled by experienced animal caretakers. The pigs will be sacrificed before collecting the tissue samples.

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.

Literature has been reviewed when designing the experiment (Kar et.al. 2021). Production and use of organoids as an in vitro model is extensively studied in human and in rodents for human biomedicine, but also, to limited extent, in farm animal species. The effect of age on production of organoids and on the adequacy of organoids as in vitro model has not yet been studied in farm animals and humans. Therefore, there is no repetition.

Reference

Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research* 52: 43.

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.

Pigs will be kept at a commercial/experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial/experimental pig facility.

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

In the selected pig facility piglets are born and raised, which prevents stress due to transport. Furthermore, pigs are housed in groups and handling will be done by experienced animal caretakers.

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.

Pigs will be euthanized as per the guidance provided in the document 'Euthanasie proefdieren_DEC_10021', before collecting tissue samples. The procedure will be executed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to reduce stress. The pig will be transferred to a separate dissection room where the pig will be euthanized and appropriate tissue samples will be collected. Tissue samples must be collected within 1 hour after slaughter. Therefore, one pig at a time will be sacrificed to prevent unusable tissue samples.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Repeated body weight measuring and associated handling may induce stress.

Explain why these effects may emerge.

We expect the (repeated) handling only during body weight measurements would not cause any severe or chronic adversity in the pigs.

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

Pigs will be habituated or familiarized with the animal caretakers to minimize any fear or stress caused during handling. Pigs will be approached calmly.

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).

Repeated handling of the pigs for body weight measures and using a needle for the injection to euthanize the pigs before sacrifice is classified as mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Collection of relevant tissue samples for producing appropriate organoids particularly from small intestine and respiratory tract are not possible without sacrificing the pigs.

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

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

Yes

Form

Project proposal• This form should be used to write the project proposal of animal procedures.

- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website(www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- | | | |
|-----|--|---|
| 1.1 | Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 5.1 lid2h |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | 5.1 lid2h |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model |

2 Categories

- | | | |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
<input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research
<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
<input type="checkbox"/> Higher education or training
<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
<input type="checkbox"/> 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.
-

Motivation

There is an increasing demand for replacing animal models by alternatives, because of animal welfare (3R principle). Therefore, there is a need for appropriate in vitro cellular models that can closely represent the physiology of animal and human tissues. The current in vitro or ex vivo models have limitations. For instance, immortalised cell lines differ significantly from cells of origin. Furthermore, as they contain only one cell type, they give a poor representation of the tissue of origin. Furthermore, the primary cell cultures are short lived and involves handling of the animals to collect relevant tissues to initiate the cultures.

During the last decade, developments in cell biology showed that it is possible to grow and maintain three-dimensional (3D) organ-like structures in culture for virtually indefinite time. These structures, called organoids, contain multiple cell types, resemble the in vivo tissue, and recapitulate key function(s) of the organ. Organoids can be derived from individual humans or animals, enabling e.g. patient-specific drug testing.

Currently, organoids are massively applied in biomedical research. Similarly, organoids can be used in veterinary and animal production research, for studying mechanisms of diseases, e.g. by looking at the interaction of organoids with pathogens, or for studying complex traits, such as resilience and feed efficiency (Kar et al., 2021). Organoids can be a good tool for breaking-down these complex traits in well-defined molecular phenotypes. Organoids could thus provide an in vitro research platform for accurate and reproducible measurements of well-defined molecular variables in relation to animal genotype, or in response to feed, management, or veterinary treatments.

Thus, organoids may increasingly replace animal experiments. This project builds on organoid technology, pioneered for mice and humans (Sato and Clevers, 2013), and developed also for pigs (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2018). Results of this project will enable researchers and industries in the field of animal husbandry and health to implement the in vitro model system as a phenotyping and screening tool.

To implement this in vitro tool in practice, it is important to scale up the model system and further develop the model as a phenotyping and (functional) screening tool. The primary parameter of this project is biological knowledge to apply organoids in livestock and veterinary research. In animal research, age of the animal is an important factor that can have an effect on the results. So far, slaughterhouse (Ellen et al., 2018) or young animal (Van der Hee et al., 2018) material has been used to produce organoids. We hypothesize that there will be no effect of animal's age on the produced organoids. However, no studies have been done to investigate this. For future applications, animal age is important, especially when it is possible to collect tissue on living animals.

Background and context

The project of the current CCD proposal is part of larger research programmes, aiming to use organoids to 1) understand complex traits of animals, such as (feed) efficiency, health, resilience, host-microbe interactions and welfare, to improve selective breeding for these traits, and 2) as a screening tool of different feed/functional ingredients for nutritional research.

In this context, the potential use of organoid in vitro models to understand mechanisms of, and to define new phenotypes will be studied. In the projects, the focus is on using organoids to study feed efficiency and intestinal functionality of pigs. Furthermore, the research programmes are aimed at reducing research models based on live animals by in vitro research models using organoid culture technology, in research institutes as well as in animal feed and breeding industry. Organoids will be

used to measure nutrient uptake and epithelial response and to screen different feed/functional ingredients to reduce in vivo animal testing. Furthermore, the impact of biological factors, like the age or the phenotype of the animals, on the organoid model will be investigated. Knowledge and tools developed in this project will benefit other industries (e.g. (veterinary) pharma and food) as well, to use organoids as a screening tool for nutrients, drugs, or chemicals. Besides, pigs are often used as a model for human (e.g. nutrition; Miller and Ullrey, 1987).

References

- Ellen et al., 2018. Intestinal stem-cell organoids as experimental models to investigate feed efficiency. EAAP annual conference
- Foulke-Abel et al., 2014. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 239, 1124-1134.
- Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research* 52: 43.
- Miller and Ullrey, 1987. The pig as a model for human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 7: 361-382
- Sato and Clevers, 2013. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340: 1190-1194
- Van der Hee et al., 2018. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research* 28: 165-171

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?

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals.

General objective

The general objective of this project is to validate and improve the current 3D and 2D in vitro organoid method using different cells/tissues from pigs, to apply this as a phenotyping tool for livestock and veterinary research, and to investigate the impact of biological factors (animals age) on the organoid model system. Tools will be developed to perform transport studies (using different nutrients and feed/functional ingredients or additives) and to test the reaction on different agents (e.g. LPS, E. coli) to test differences between organoid cultures. The ultimate goal of this project is to use organoids as an in vitro method to phenotype without conducting animal experiments, that is applicable in commercial situations.

The specific objectives of this project are

1. Validate and improve known in vitro organoid methods to accurately grow 3D and 2D organoids from tissue materials obtained from pigs slaughtered at the slaughterhouse. This work will not involve animal procedures on live animals and animals used have not been involved in any animal experiment.
 - o We will start with porcine tissues, specifically from the intestine, as we already have experience with, and successful methods for, porcine intestinal organoids.
 - o We will continue with the validation and improvement of the method(s) to generate organoids from other tissue(s) like liver (for drug purposes (pharma)) and respiratory tract (for health purposes).
 - o We will compare in vitro functionality of organoids with in vivo performance of pigs with prior known genetic contrast in specific phenotypes. In this way, it can be validated if and how organoids can be used as a model or proxy for in vivo animal functionality and performance.
2. To investigate the effect of age of animals on 1) the adequacy of the in vitro organoid models grown from tissue collected at different ages to represent in vivo functionality, 2) differences in the

organoid system and gene expression, and 3) the ease of growing organoids. Pigs used have not been involved in any animal experiment.

- o We will use tissue collected at four different ages from sacrificed piglets (1, 4 and 11 weeks of age) and pigs slaughtered at the slaughterhouse (26 weeks of age). Tissue from intestine, liver, and respiratory tract will be used.

- o Digesta samples from the gastro-intestinal tract will be collected from the sacrificed and slaughtered pigs for measuring the digestibility of nutrients. This will further aid in understanding the contrast between high and low feed efficient cohort of pigs.

A go/no go decision will be made in between objective 1 and 2.

In the course of the whole project, transport studies (using different nutrients and feed ingredients or additives) and reaction on agents (e.g. LPS, E. coli) will be performed using two dimensional (2D) organoid monolayers. This will be applied to test differences between organoid cultures generated from tissue of the same animal or from different animals. Differences in response to a challenge or nutrition will resemble the in vivo situation. Furthermore, in the course of the whole project, we will cryopreserve and store original tissues and derived organoids from pigs slaughtered at a slaughterhouse (objective 1) or sacrificed during life (objective 2). Pigs used to collect tissue samples have not been involved in any animal experiment. The cryopreserved material can remain viable for a prolonged time and will be made available on reasonable request as resource for future research in breeding, nutrition, or veterinary research.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Using pigs, we already successfully produced and used organoids from intestinal tissue from a small number of slaughterhouse pigs. In this project, current methods will be optimized and applied in practice on a large scale. Globally, organoids have been grown from many different organs/tissues in a very large number of vertebrate species.

It has been demonstrated that organoids can be dissociated and seeded onto Matrigel- or Collagen-coated Transwell membranes to form 2D epithelial monolayers (Foulke-Abel et al., 2014). These 2D cultures allow the study of interactions with apically applied exogenous stimuli, such as pathogens, feed ingredients (Kar et al., 2020) or compounds (nutrients, drugs, chemicals). Within previous studies, transport studies and reaction on agents have been performed using 2D monolayers. Furthermore, in literature there are numerous examples measuring in vitro functionality of organoids from pigs, like reaction on pathogens or other stimuli, epithelial integrity, transport of electrolytes and nutrients, which will be used in this project to find associations with in vivo phenotypes (Kar et al., 2021).

In this study, we will start with collecting tissue from pigs slaughtered at the slaughterhouse. First, we will focus on the optimization and validation of the intestinal organoid system. Using slaughtered pigs, tissue from other organs (liver, respiratory tract) will also be collected and cryopreserved. Tissue collected and organoids produced will be stored as resource for future research.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

References

Foulke-Abel et al., 2014. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 239, 1124-1134.
Kar et al., 2020. Effects of undigested protein-rich ingredients on polarised small intestinal organoid monolayers. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11: 51
Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research* 52: 43.

3.3 Relevance

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

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

Scientific relevance

Organoid biology is one of the most promising recent advances in life science. The annual number of scientific papers published on the subject has been growing exponentially ever since 2010. Currently, applications of organoids are being researched and applied in human biomedical research, e.g., for measuring patient-specific efficacy of drugs, as a model to study host-microbe interactions, to investigate mechanisms of diseases, or for regenerative medicine. Compared with studies in the field of human medicine, the number of organoid studies in livestock and veterinary research is falling behind, although research on organoids in the latter fields is gaining momentum (Kar et al., 2021). Currently, there is an increasing interest from feed, pharma, and breeding companies and - research communities to use organoids in livestock species as a potential discovery platform that can partly replace animal experiments. The proposed research project aims to develop and validate methods to culture, maintain, and use organoids as research platform for accurate and reproducible measurements of well-defined 'molecular' variables underlying animal performance. Also, the project will contribute to fundamental organoid and stem-cell biology for pigs. The results obtained in this project will be published in peer-reviewed high impact journals.

Societal relevance

Society at large, including research communities and livestock industry, would like to reduce the number of experimental animals used. Use of an organoid platform for measurements of well-defined 'molecular' variables underlying animal performance could partly replace as well as reduce animal experiments in animal nutrition, pharma, and breeding industries and research. In addition, such in vitro tools are considered to be more cost-effective, and possibly more informative, precise, and accurate, than animal experiments. In animal breeding, organoid based phenotyping tools can be combined with 'genomic selection' aimed at improving important traits related to animal health and resource efficiency.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

Knowledge generated in the project will be of high interest for breeding, nutrition and pharmaceutical companies. Breeding companies can use organoids as a phenotyping tool to study complex traits like feed efficiency and to select animals based on the molecular characteristics of organoids. Nutrition companies can use organoids as a screening tool to test functional feed ingredients. Pharmaceutical companies can use organoids to test specific drugs. Furthermore, using organoids will enable the reduction of experimental animals.

Reference

Kar et al., 2021. Organoids: A promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. Veterinary research.

3.4 Research Strategy

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

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

The main goal of the project is to develop and validate methods to produce and use organoids from different cells/tissues from pigs, as in vitro model for livestock and veterinary research. To reach this goal, we have 2 phases. Each phase will be evaluated and will influence the set-up of the next phase. The project consists of the following phases:

1. Validation and improvement of the 3D and 2D organoid model system using slaughterhouse material.
 2. Investigate the effect of age of animal on the organoid model system – Appendix 1.
- Phase 1 will not involve animal procedures but only tissues collected from pigs slaughter at the slaughterhouse. We will develop a robust organoid model system and we will validate the organoid system comparing in vitro functionality of organoids with in vivo performance of animals with prior known genetic contrast in specific phenotypes. After phase 1 there will be a go/no go decision moment. We will continue with phase 2 when the success rate of produced organoids is above the 70% and when we are able to produce intestinal organoids on a larger scale (10 samples at the same time).

Phase 2 will involve animal procedures on live pigs. Here we will investigate the effect of animal's age on the organoid model system. Therefore, organoids derived from tissue samples collected at different ages will be compared with each other. Organoids will be derived from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We expect no effect of the ante- and post-mortem environment of the pigs on the produced organoids. Besides, the culture condition to generate the organoids includes antibiotics that prevent any bacterial infections. Male pigs will be used to collect the tissue samples as there is no clear indication in literature regarding the information of the gender effect on the organoid culture system.

For each phase, we will first work with pig intestinal tissues. Depending on the techniques developed to produce organoids from the intestines, we will also use tissues from other pig organs, such as the liver and respiratory tract, and work on developing methods for producing organoids from these tissues.

The two phases are clearly linked. Methods for porcine intestinal organoids have been developed, but in phase 1 (no animal experiment) these methods will be validated and if necessary improved to accurately grow 3D and 2D organoids (milestone 1) using slaughterhouse material from pigs. In Phase 2 (Appendix 1), the effect of animal's age on the organoid model system will be investigated (milestone 2). Organoids grown and tissue collected in the two phases will be stored in a repository, to be used in future experiments (milestone 3). In this project the focus is on pigs, but knowledge gathered in this project can be translated to other (livestock) species.

Storage of biological material and data

During both phases, tissues collected and organoids derived from the tissues will be cryopreserved and stored as a biorepository, which will remain available to the research community for future research on reasonable request. Data collected in this project will be stored according to the data management plan of [5.1 lid2h](#). Primary data will be stored in a biorepository, which will be available for future research. Adapted (gene expression data and organoid read-outs) will be stored at the High-performance computer data storage, which generates automatic data back-up. Information on adapted data and analytical pipelines will be available through Github. Data handling for publications will be recorded in lab journals, which will be kept 5 years after publication of the manuscript.

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.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The overall project consists of two phases. We will first start with phase 1 to improve and validate the model system that is currently used to produce organoids. If we attain to produce organoids in a robust manner and have a success rate above 70%, we continue with phase 2 to investigate the effect of animal age on the organoid model system. The described strategy in 3.4.1. will not have an

effect on the number of animals needed. Furthermore, impact on animal welfare will be kept at a minimum using the strategy described above.

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

3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

<u>Serial number</u>	<u>Type of animal procedure</u>
1	Study effect of animal age on organoid models; Tissues collected after sacrificing pigs

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

<u>Serial number</u>	<u>Type of animal procedure</u>
1	Appendix-1 Study effect of animal age on organoid models tissues collected after sacrificing pigs

Naam van het project	Valideren en optimaliseren van organoïden ter vervanging van metingen aan levende varkens
NTS-identificatiecode	NTS-NL-029298 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	Varkens organoïden in vitro vervanging voor dierproeven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Gastro-intestinaal stelsel met inbegrip van de lever Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding

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>Doelstellingen</p> <p>De algemene doelstelling van dit project is het valideren en verder ontwikkelen van methoden om organoïden te maken die gebruikt kunnen worden voor onderzoek en het verrichten van metingen ter vervanging van experimenten met landbouwhuisdieren, hier specifiek varkens. Organoïden zijn cellen die in structuur en functie lijken op kleine mini-orgaantjes.</p> <p>Organoïden worden nu nog vooral voor humane doeleinden ingezet, zoals onderzoek naar het gericht in zetten van medicijnen. Echter voor landbouwhuisdieren kunnen organoïden ook een wezenlijk bijdrage leveren waarbij ze ingezet kunnen worden om te fenotyperen of voer ingrediënten en medicijnen te testen. In dit project zullen we organoïden van varkens darmen, maar mogelijk ook van de lever en luchtwegen, gebruiken.</p> <p>Voor de ontwikkeling van de methoden zal met name slachthuisweefsel van varkens gebruikt worden. Waarbij we met name willen kijken of kenmerken gemeten aan organoïden voorspellend zijn voor dierkenmerken, zoals ziekteverstand of voer efficiëntie. Daarnaast kijken we binnen dit project naar het effect van dierkenmerken op de geproduceerde organoïden, waarbij we ons in dit project richten op het effect van leeftijd.</p> <p>Uitgangswaarsels én gekweekte organoïden worden ingevroren voor vervolgonderzoek.</p>
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, 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).	<p>Maatschappelijk belang</p> <p>De samenleving als geheel, onderzoeksinstituten en dierlijke bedrijfstakken, willen graag experimenten met dieren verminderen. Organoïden kunnen hier mogelijk aan bijdragen. Daarnaast kunnen organoïden ingezet worden om de onderliggende biologie van kenmerken, zoals ziekte of opname van voedingsstoffen, beter te begrijpen. Wat zal resulteren in een verbeterde diergezondheid en duurzaamheid van landbouwhuisdieren.</p> <p>Wetenschappelijk belang</p> <p>Onderzoek met organoïden is één van de meest veelbelovende nieuwe onderwerpen in de levenswetenschappen. Dit onderzoek draagt bij aan de inzet van organoïden om de gezondheid en duurzaamheid van landbouwhuisdieren te verbeteren. Verder draagt het bij aan fundamentele aspecten van de biologie.</p>

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>In dit project zullen we weefsel verzamelen van varkens in het slachthuis en van varkens die op verschillende leeftijden geëuthanaseerd worden. Tijdens het project zullen de varkens in groepen gehuisvest worden waarbij ze op verschillende momenten gewogen worden en individuele voeropname bepaald wordt. De varkens worden geëuthanaseerd. Na het euthanaseren wordt er weefsel van de darmen, lever, en luchtwegen afgenomen.</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>Varkens zullen gehuisvest worden in commerciële onderzoeksfaciliteiten. Huisvesting zal geen ernstige gevolgen hebben voor dierenwelzijn. De geplande dierhandelingen geven een "licht" ongerief.</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 varkens worden geëuthanaseerd voordat weefsel verzameld wordt. Aan levenden dieren kan op dit moment geen weefsel verzameld worden van bepaalde delen van de darmen, de lever en de luchtwegen. Hierdoor dienen de dieren eerst geëuthanaseerd te worden.</p>					
			<p>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
	<p>Varkens (Sus scrofa domesticus)</p>	<p>30</p>	<p>0</p>	<p>30</p>	<p>0</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.

Doel is om methoden te valideren en verder te ontwikkelen voor het maken van organoïden ter vervanging van dierproeven. Bij de ontwikkeling van methoden wordt slachthuismateriaal gebruikt. Voor het onderzoek naar leeftijd moeten varkens op verschillende leeftijden geëuthanaseerd worden om weefsel te verzamelen. Dit kan niet worden vervangen door diervrije proeven of door proeven met andere diersoorten.

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.

In dit project worden verschillende projecten gecombineerd die gericht zijn op het gebruik en de toepassing van organoïden in onderzoek dat zich richt op landbouwhuisdieren. Weefsel monsters van verschillende organen (darmen, lever en luchtwegen) worden verzameld van hetzelfde dier, om zo het aantal dieren te reduceren. Voor het valideren en de verdere ontwikkeling van de methode wordt weefsel uit het slachthuis gebruikt. Varkens die in dit project gebruikt worden zijn niet betrokken geweest bij andere experimenten. Daarnaast worden alleen standaard metingen toegepast zoals het meten van lichaamsgewicht en individuele voeropname. Het aantal dieren is gebaseerd op basis van power berekeningen en op basis van kennis van voorgaande experimenten waarbij organoïden zijn gebruikt om verschillen aan te tonen tussen dieren. In dit project zullen alle weefsel monsters en organoïden opgeslagen worden in een bio-bank voor toekomstig onderzoek.

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.

Voordat weefsel verzameld wordt, worden de varkens geëuthanaseerd. Het euthanaseren van varkens zal uitgevoerd worden door een ervaren dierenarts of een gecertificeerd dierversorger om de stress die de varkens ervaren te minimaliseren. De dierversorgers zullen de dieren tijdens de handelingen rustig benaderen. De varkens worden verplaatst naar een aparte ruimte waar ze geëuthanaseerd worden en het weefsel verzameld wordt. Het weefsel wordt binnen een uur na euthanaseren verzameld. Hierdoor wordt er maar 1 varken per keer geëuthanaseerd, om verliezen te voorkomen. Er is geen verdere verfijning mogelijk.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

In dit project worden varkens gebruikt, omdat we al ervaring hebben met het maken van varkens organoïden. De varkens zullen geëuthanaseerd worden op een leeftijd van 1, 4 en 11 weken om weefsel en darmverteringsmonsters te verzamelen. Er is voor deze leeftijd gekozen omdat er rondom deze leeftijden veranderingen plaatsvinden in het functioneren van de darmen door veranderingen in voeding (week 4, spenen) en huisvesting (week 11 worden varkens vaak verhuisd naar een andere locatie). Verder zijn varkens vanaf ongeveer 11 weken immunologisch volwassen. Daarnaast zullen we weefsel in het slachthuis verzamelen.

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: maandag 9 augustus 2021 11:56
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202115276
Bijlagen: 2021.D_0006_PP_5_.pdf; 20210623_NTS_template_ontsmet.xlsx; 2021.D_0006_DAP_2_.pdf; 2021.D_0006_PV_3_jl.pdf

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: "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" en aanvraagnummer: AVD 5.1 lid2h 202115276.

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 09-08-2021, 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 09-08-2021 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

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Geachte CCD,
Onderstaand het advies dat de **5.1 lid2h** geeft aangaande het betreffende project.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD****5.1 lid2h** **202115276**
2. Titel van het project: Influence of age and sex in organoids of pigs
3. Titel van de NTS: Effect van leeftijd en geslacht op varkens organoïden
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
5.1 lid2h
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 09-08-2021
Aanvraag compleet: 09-08-2021
In vergadering besproken: 09-08-2021 en 13-09-2021
Termijnonderbreking(en) van 12-08-2021 tot 13-09-2021
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
Aanpassing aanvraag: n.v.t.
Advies aan CCD: 20-09-2021
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager
n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 12-08-2021
Gestelde vragen *en antwoorden*:
 - Het project is lastig te begrijpen en moeilijk geschreven. Gaat het nu om de validatie van een model, de ontwikkeling van een model of om beiden? Door de veelheid aan tekst ziet men niet meer goed waar het in dit project nu om gaat. In de ogen van de DEC staat er veel meer beschreven dan nodig voor het begrijpen van het project. De DEC is van mening dat het project waarschijnlijk relatief eenvoudig is maar dat door de ingewikkelde manier van opschrijven dit heel veel vragen oproept. Volgens de DEC gaat het er enkel om het oogsten van slachthuismateriaal en weefselmateriaal van proefdieren voor verder onderzoek en die resultaten dan te vergelijken. De DEC verzoekt u het project terug te brengen tot de essentie.
We agree and have rewritten the proposal. The general goal of this project is now to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and various age-related moments in the life of a slaughter pig of either sex, using gene expression as a read-out. Given the general comments and suggestions provided by DEC, we have tried to keep only the essential parts necessary to describe the experiment.
Parts that have been changed in the proposal are:
3.1: Motivation: shortened
3.2: Purpose; General objective: Adopted (as described below)
*3.2.1: Considering the suggestions and remark from the DEC, we have changed the goals into: **General objective** The general objective of this project is to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and various age-related*

moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as a read-out. Our objective is to investigate the effect of slaughterhouse material compared to age-related moments in the life of slaughter pigs, we will perform gene expression analysis on the cultured organoids. Tissues of interest will be obtained from either sacrificed piglets (1, 4 and 11 weeks old) or from slaughtered pigs (26 weeks old). Tissues of interest includes intestine, liver, organs and tissue from respiratory tract, and skeletal muscle.

3.4 strategy: The general objective of this project is to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as a read-out (Appendix 1). The project requires the involvement of animal procedures on live pigs. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We do not expect the ante- and post-mortem environment of the pigs on the cultured organoids. In addition, the organoids will be cultured under antibiotic conditions to prevent any bacterial infections. Pigs of both sexes will be used in equal numbers (n=30 males and 30 females) for sampling. At each time-point, i.e. 1, 4 and 11 weeks of age, we will sacrifice 10 male and 10 female pigs.

- De DEC vraagt zich af wat men nu waarmee wil vergelijken. Alleen leeftijd? En wat is dan de controlegroep?

Currently mainly slaughter house material is used for the production of organoids. However, age-related moments are important for the feed industry. But we do not know if there is an effect of age on organoids. Therefore, we will compare organoids cultured from tissues of different age-related moments in life with organoids cultured from slaughterhouse material. The slaughterhouse group will serve as reference. Also, based on the proposal from DEC, we will compare organoids from male and female pigs to examine the effect of sex.

- De DEC denkt te begrijpen dat het er om gaat dat men "interessante" leeftijd gerelateerde momenten in het leven van een slachtvarken (zoals spenen en andere door het houderijsysteem opgelegde interventies) wil vergelijken met weefselmateriaal verzameld in het slachthuis (op ca. 26 weken leeftijd). De hypothese is dan dat er geen verschil is tussen slachthuismateriaal en materiaal verkregen in de verschillende leeftijdsfasen van het varken. In dat geval zou men altijd kunnen volstaan met slachthuismateriaal. Echter, de DEC vraagt zich af of die hypothese getoetst kan worden wanneer men slechts 1 type dier en 1 geslacht bekijkt. In Uw antwoord op de vragen van de IvD geef u aan dat geslacht niet uitmaakt. Waarom kiest U dan toch voor enkel mannelijke dieren?

We decided to include both male and female animals in the project to answer the question of whether there is a sex effect. The number of animals has now been increased from 30 to 60. Wat is nu de "need to know" over leeftijd? De DEC kan snappen dat bepaalde leeftijdsmomenten relevant kunnen zijn, maar vervolgens is de hypothese dat leeftijd geen effect zal hebben. Dat matcht dan niet in de ogen van de DEC, en haalt je bij wijze van spreken het model onderuit.

Within the production system, there are important age-related moments in the life of pigs that are of particular interest to animal nutritionists. Research is being conducted to develop and discover innovative nutritional strategies that can support animals especially at critical life stages, to maintain both productivity and health. To this end, organoids can be used as an in vitro tool. However, we do not have the answer whether there is an age effect on the organoids produced or cultured. As long as we do not observe a significant difference between organoids from slaughterhouse material and organoids from different ages, only slaughterhouse material can be used for organoid-based research in pigs in the future.

- In het kader van vermindering: De DEC vraagt zich af of hier speciaal dieren voor geofferd moeten worden of dat hier alternatieven voor zijn. De DEC wil hier graag meer over opgenomen zien in de aanvraag. Kunt u bijvoorbeeld gebruik maken van dieren afkomstig uit ander onderzoek? Ook ziet de DEC graag dat u zich maximaal inspant op de dieren zo goed mogelijk te verwaarden: zelf meer weefsels onderzoeken, of materiaal ter beschikking stellen aan collega's voor hun onderzoek.

We have searched for alternative pig studies from other research in which pigs are sacrificed, on days of interest. Unfortunately, we were unable to find suitable pig studies – we have included this information in 3.1. Background and context. To maximize the value of the animals we will collect tissue samples from other organs of interest, such as liver, organs and tissues from the respiratory tract, and skeletal muscle, which will be stored appropriately and can be used for further research upon request.

- De responsvariabelen zijn niet goed gedefinieerd. Het is niet duidelijk wat u nu precies met de organoïden wil doen. U zegt dat u organoïden van verschillende leeftijden wil

maken om te kijken of die hetzelfde zijn maar waarin moeten ze dan hetzelfde zijn? Wat wilt u meten? En hoe gaat u vervolgens valideren? Wat gaat u dan valideren? De DEC krijgt dat niet helder en verzoekt u dit te verduidelijken. In basis zijn stamcellen identiek. Wanneer je functietesten zou willen doen zijn mogelijk alle organoïden onbruikbaar. Hoe kijkt u daar tegenaan?

Based on general comments and suggestions from DEC, we have restated our goal. The general goal of this project is now to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and various age-related moments in the life of a slaughter pig of either sex, using gene expression as a read-out. We have adapted this throughout the proposal and in the appendix. As long as we do not observe a significant difference between organoids from slaughterhouse material and organoids from different ages, only slaughterhouse material can be used for organoid-based research in pigs in the future.

- Het is de DEC niet duidelijk wat u zou willen valideren en dan verder wil ontwikkelen. Zou u dit beter willen concretiseren?

We have restated our goal. The general goal of this project is now to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and various age-related moments in the life of a slaughter pig of either sex, using gene expression as a read-out.

- Als uw hypothese nadrukkelijk is dat u géén verschil wil aantonen dan vraagt de DEC zich af of een power van 80% voldoende is. Kan men een type-2-fout daarmee voorkomen? Is een power van 90% dan niet te prefereren?

We have restated our goal and demonstration of a "difference" is included.

We have changed the power to 90% and calculated the sample size. We have adapted this throughout the proposal (3.4.2) and in the appendix (A-statistical methods; We performed a two-sided power analyses, with a significance level of 0.05, and a power of 90%, and 10 pigs per sex per time-point, resulting in an effect size of 1.53. This means that differences greater than 1.53 in gene expression between comparisons are considered significant. We assume that 10 male and 10 female pigs at each timepoint is sufficient to examine the age effect).

- Conclusie: Samenvattende kan gesteld worden dat ontbreekt waar u de organoïden voor gebruikt, dat u vervolgens wil onderzoeken of het uitmaakt waar de stamcellen vandaan komen en of de leeftijd van de stamcellen van invloed is. Het zou duidelijker worden wanneer de justification beter verwoord wordt: in welke literatuur heeft u aanwijzingen gevonden dat leeftijd een verschil zou maken (of niet). Wat is er al over bekend? Wat rechtvaardigt dat men nu dit onderzoek moet doen? Er zijn zoveel vragen dat de DEC het niet mogelijk acht om op dit moment een ethische toetsing uit te voeren.

There is strong evidence in the human literatures suggesting that adult stem cells appear to age with the person. As stem cells age, their functional ability also deteriorates (Brack et al., 2007; García-Prat et al., 2013; Oh et al., 2014; Schultz and Sinclair, 2016). However, we could not find any literature in livestock species, especially in pigs, demonstrating the influence of age on the stemness. Such knowledge is crucial for the use of organoids as an in vitro tool in livestock research. As long as we do not observe a significant difference between organoids from slaughterhouse material and organoids from different ages, only slaughterhouse material can be used for organoid-based research in pigs in the future.

We hope that we have responded satisfactorily to all comments and that the proposal now reads clearly and trust that it is now possible to conduct an ethical review.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag (tekstueel, qua opzet en de titel).

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

- N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Er is geen betrokkenheid bij het betreffende project van DEC-leden.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat, na herschrijven door de onderzoeker, de aangepaste aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het karakteriseren van de verschillen of overeenkomsten tussen het slachthuismateriaal en verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van een slachtvarken van beide geslachten.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is organoïden inzetten als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen zoals veerkracht tegen ziekte en voerefficiëntie te bestuderen met inzet van minder/geen proefdieren.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - De proefdieren binnen het voorliggende project hebben een negatief moreel belang aangezien de dieren stress zullen ervaren als gevolg van de handelingen en ze zullen worden gedood t.b.v. het verkrijgen van weefsels. Wel is het zo dat wanneer het project slaagt, dit tot gevolg kan hebben dat er in de toekomst minder proefdieren ingezet hoeven te worden en volstaan zou kunnen worden met slachthuismateriaal om organoïden te produceren.
 - De (humane en dierlijke) patiënten hebben een positief belang bij een model waarmee ziektemechanismen bestudeerd kunnen worden en (relatief) eenvoudig potentiële interventiestrategieën in een vroeg stadium geëvalueerd kunnen worden.
 - De onderzoekers en CRO hebben een positief kennisbelang bij het vergaren van kennis en een economisch belang omdat dit onderzoek in opdracht wordt uitgevoerd.
 - De (veterinaire) farmaceutische industrie heeft een positief economisch belang wanneer zij organoïden in kunnen zetten als screening tool.
 - De (dier)voedingsindustrie heeft ook een positief economisch belang wanneer zij organoïden kunnen inzetten en daardoor sneller meerdere voedingsstoffen kunnen testen en minder kosten maken aan dierproeven.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. De antwoorden die de onderzoeker op de vragen van de DEC gegeven heeft, geven de DEC vertrouwen in de kennis en kunde van de onderzoeker.
8. De DEC heeft vastgesteld dat, na aanpassing door de onderzoeker, het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden betrokken van een commerciële onderzoeksfaciliteiten waar ze onder reguliere omstandigheden, in groepshuisvesting, gehouden worden.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: regelmatig wegen, hanteren van de dieren en euthanasie.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. De integriteit van de dieren wordt aangetast door het doden van het dier.

13. Humane eindpunten zijn niet gedefinieerd omdat die niet te verwachten valt. De DEC is het hiermee eens.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Wanneer het onderzoek slaagt zullen er in de toekomst minder proefdieren nodig zijn omdat dit onderzoek zich juist richt op de ontwikkeling van een alternatief.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Na vragen van de DEC hierover heeft de onderzoeker de aantallen dieren aangepast. De DEC is van mening dat er nu een realistisch aantal dieren gebruikt wordt. De DEC vraagt zich wel af of trapsgewijs uitvoeren (met go/no go's) van het project o.b.v. leeftijd van de dieren (starten met de jongste dieren omdat deze het meest afwijken van slachtleeftijd) een optie is om het aantal dieren in het onderzoek te verminderen.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.
17. Er is geen sprake van wettelijk verplicht onderzoek; de vraag over duplicatie is niet van toepassing.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden, na aanpassing in het project, van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. Het is niet mogelijk om de benodigde weefsels af te nemen bij dieren die in leven blijven. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Herplaatsing of hergebruik is n.v.t.

NTS

21. De NTS is naar het oordeel van de DEC begrijpelijk geformuleerd, maar niet op alle punten aangepast n.a.v. de vragen die de DEC gesteld heeft en in om die reden niet meer op alle punten (o.a. beide geslachten) een goede afspiegeling van het aangepaste project.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het directe doel van het project, het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal verzameld op verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van mannelijke en vrouwelijke slachtvarkens, het lichte ongerief en de aantasting van de integriteit van 60 proefdieren?
2. De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan de inzet van organoïden als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen te bestuderen.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren in dit project ervaren licht ongerief. De integriteit van de dieren wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert dit als een groot belang van grote morele waarde.
- Echter, hier tegenover staan toekomstige proefdieren. Wanneer organoïden ingezet kunnen worden dan zijn minder proefdieren nodig in de toekomst. De DEC waardeert dit ook als een groot belang van grote morele waarde.
- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een belang van geringe morele waarde ziet.
- De humane en dierlijke patiënten kunnen in de toekomst belang hebben bij de resultaten van dit onderzoek wanneer het model met organoïden ingezet kan worden voor testen en ontwikkelen van behandelmethoden. De DEC waardeert dit als een reëel belang van geringe morele waarde.
- De farmaceutische industrie heeft een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

- Ook de (dier)voedingsindustrie heeft in de ogen van de DEC een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

De DEC heeft gediscussieerd of de laatste 3 belanghebbenden niet heel ver in de toekomst liggen. De onderzoeker noemt ze wel maar de DEC is van mening dat dat voor dit project nog niet aan de orde zal zijn en dat het doel van dit project zal zijn om een model te ontwikkelen en te kijken of dat model geschikt is. Om die reden geeft de DEC aan de laatste 3 belanghebbenden, in deze fase van ontwikkeling, een geringe morele waarde.

3. Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal verzameld van levende slachtvarkens t.b.v. het ontwikkelen van een model met organoïden met maximaal licht ongerief voor maximaal 60 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.
De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op meerderheid van stemmen.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.

Met vriendelijke groet,

5.1 lid2e
5.1 lid2e



Centrale Commissie Dierproeven

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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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 Provide the title of the project.

Influence of age and sex in organoids of pigs

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

 Basic Research

 Translational or applied research

 Regulatory use of routine production

 Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare

 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 2.1.

Motivation

In the last decade, developments in cell biology have shown that it is possible to grow three-dimensional (3D) organ-like structures in culture and maintain them for virtually indefinite period of time. These structures, known as organoids, contain multiple cell types that resemble tissue, unlike current *in vitro* or *ex vivo* models. In addition, organoids recapitulate the key function(s) of the organ of origin. Organoids can be obtained from individual humans or animals, allowing for example patient-specific drug testing.

Currently, organoids are used extensively in biomedical research. Similarly, organoids can be used in veterinary and animal production research to explore disease mechanisms, e.g. by studying the interaction of organoids with pathogens, or to study complex traits such as resilience to diseases and feed efficiency (Kar et al., 2021). Organoids can be used as an *in vitro* (reductionist) tool to break-down these complex traits into well-defined molecular phenotypes. Organoids could thus provide an *in vitro* research platform for accurate and reproducible measurements of well-defined molecular variables in relation to the genotype of the animal, or in response to feed, management or veterinary treatments.

Organoids could increasingly replace animal testing. This project builds on organoid technology developed for mice and humans (Sato and Clevers, 2013) and also for pigs (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2018). However, to date, the system is often initiated with tissue materials collected at the slaughterhouse or sometimes from sacrificed animals in specific animal studies (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2020). Most of these studies have shown that it is possible to culture organoids. One study validated the model in terms of similarity to the corresponding cell line (Van der Hee et al., 2020). However, from the published scientific literature we were unable to obtain information on the effects of breed, sex and/or age on cultured intestinal organoids of pigs. There is strong evidence in the human literatures suggesting that adult stem cells appear to age with the person. As stem cells age, their functional ability also deteriorates (Brack et al., 2007; García-Prat et al., 2013; Oh et al., 2014; Schultz and Sinclair, 2016). However, we could not find any literature in livestock species, especially in pigs, demonstrating the influence of age on the stemness. Such knowledge is crucial for the use of organoids as an *in vitro* tool in livestock research.

In this proposal, we aim to characterize the differences- or similarities between the slaughterhouse material (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2020) and different age-related moments in the life of a slaughter pig using gene expression as measurement. Although a possible sex-specific effect has been suggested in the scientific literature on human and rodent nothing is yet known in pigs, so we will use both female and male animals. To date, information on the effects of age on cultured organoids of pigs is lacking. However, age-related moments are important for the feed industry, as different nutritional requirements must be met for each life stage. The results of this project will enable researchers and companies in the field of animal husbandry and health to use the *in vitro* model system as a tool for phenotyping and screening.

Background and context

The project of the current CCD application is part of a larger research program that aims to use organoids to 1) understand complex animal traits to improve selective breeding for these traits such as (feed) efficiency, health, resilience, host-microbe interactions, and welfare, and 2) as a screening tool for various feed/functional ingredients for nutritional research.

In this context, the potential use of organoid *in vitro* models to understand mechanisms and define new phenotypes will be explored. This project will focus on the use of organoids to study feed

efficiency and intestinal functionality in pigs. In addition, this research aims to reduce research models based on live animals by in vitro research models such as organoid culture technology.

To maximize the value of experimental animals, we did search for alternative pig studies within 5.1 lid2h in which animals are being sacrificed. Unfortunately, we were unable to find suitable pig studies of appropriate age in which we are interested. In addition, we will be collecting other organs of interest, such as liver, organs and tissues from respiratory tract, and skeletal muscle, which will be stored appropriately and can be used for further research upon request. Besides, digesta samples will also be taken from the gastro-intestinal tract of the sacrificed and slaughtered pigs to measure the digestibility of nutrients. This will help to better understand the difference between high and low feed efficient cohort of pigs. The knowledge and tools developed in this project can also benefit other industries, such as the (veterinary) pharmaceutical and food industries. In addition, pigs are often used as a model for human nutrition research (Miller and Ullrey, 1987). These pig intestinal organoids are used to measure nutrient uptake and epithelial response as well as to screen various feed/functional ingredients to reduce in vivo animal testing.

Ellen et al., 2018. Intestinal stem-cell organoids as experimental models to investigate feed efficiency. EAAP annual conference

Foulke-Abel et al., 2014. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 239, 1124-1134.

Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research* 52: 43.

Miller and Ullrey, 1987. The pig as a model for human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 7: 361-382

Sato and Clevers, 2013. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340: 1190-1194

Van der Hee et al., 2018. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research* 28: 165-171

Van der Hee et al., 2020. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Frontiers in Cell Development and Biology* 8:375

Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando. 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317: 807-810 doi:10.1126/science.1144090.

García-Prat, L., P. Sousa-Victor, and P. Muñoz-Cánoves. 2013. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *The FEBS Journal* 280: 4051-4062 doi:https://doi.org/10.1111/febs.12221.

Oh, J., Y. D. Lee, and A. J. Wagers. 2014. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* 20: 870-880 doi:10.1038/nm.3651.

Schultz, M. B., and D. A. Sinclair. 2016. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* 143: 3-14 doi:10.1242/dev.130633.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The general objective of this project is to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and various age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as a read-out.

Our objective is to investigate the effect of slaughterhouse material compared to age-related moments in the life of slaughter pigs, we will perform gene expression analysis on the cultured organoids. Tissues of interest will be obtained from either sacrificed piglets (1, 4 and 11 weeks old) or from slaughtered pigs (26 weeks old). Tissues of interest includes intestine, liver, organs and tissue from respiratory tract, and skeletal muscle.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Using pigs, we already successfully cultured organoids from intestinal tissue of slaughterhouse pigs, we expect that our protocols can be imposed for the other age-related moments in the life of slaughter pigs. For the other non-intestinal organs necessary amendment may be required to the existing protocols from other species to culture the pig-derived organoids.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project? No Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

The biology of organoid is one of the most promising recent developments in the biological sciences. The number of scientific papers published annually on this topic has increased exponentially since 2010. Currently, applications of organoids are being explored and used in human biomedical research, e.g. to measure patient-specific drug efficacy, as a model to study host-microbe interactions, to study disease mechanisms, or for regenerative medicine. Compared to studies in human medicine, the number of organoid studies in livestock and veterinary research is rather limited, although organoid research is gaining momentum as a promising in vitro platform in livestock and veterinary research (Kar et al., 2021). Currently, there is growing interest from feed, pharmaceutical, and livestock breeding companies as well as -researchers, in the use of organoids in livestock as a potential research platform that can partially replace as well as reduce the use of animals in animal experiments. The study conducted will provide insight into the effects of collecting tissue samples at different life stages from pigs on cultured organoids. The results obtained in this project will be published in peer-reviewed journals.

Societal relevance:

Society in general, including the research communities and livestock industry, would like to reduce the number of experimental animals used. Using an organoid platform to measure well-defined "molecular" variables underlying animal performance could partially replace or reduce animal experiments in the animal nutrition, pharmaceutical, and livestock breeding industries and research. Unless we see a significant difference with respect to the objective of this project, only slaughterhouse material can be used for organoid-based research in pigs in the future.

Kar et al., 2021. Organoids: A promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. Veterinary research

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

The knowledge gained from the project will be of great interest for livestock breeding, (animal) nutrition and pharmaceutical companies. Breeding companies can use organoids as a phenotyping tool to study complex traits such as feed efficiency and select animals based on the molecular characteristics of the organoids. Nutrition companies can use organoids as a screening tool to test functional feed ingredients. Pharmaceutical companies can use organoids to test specific drugs. In addition, the use of organoids can enable the reduction of experimental animals.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Strategy:

The general objective of this project is to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as a read-out (Appendix 1).

The project requires the involvement of animal procedures on live pigs. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We do not expect the ante- and post-mortem environment of the pigs on the cultured organoids. In addition, the organoids will be cultured under antibiotic conditions to prevent any bacterial infections. Pigs of both sexes will be used in equal numbers (n=30 males and 30 females) for sampling. At each time-point, i.e. 1, 4 and 11 weeks of age, we will sacrifice 10 male and 10 female pigs.

For the purpose of this project we will initially focus on pig intestinal tissues. Depending on the techniques developed to produce organoids from the intestine, we will also use tissues from other pig organs, such as liver, respiratory tract, and skeletal muscle, and develop protocols for culturing organoids from these tissues.

As an outlook to this project, we will maximize the use of samples collected from the sacrificed animals by reusing the cultured organoids for various relevant assays, such as 2D and transwell cell culture systems that are relevant for animal nutrition research.

Storage of biological material and data

A part of this project, the collected tissues and the organoids cultured from them will be cryopreserved and stored as a biorepository, available to the research community for future research upon justified request. Data collected in this project will be stored in accordance with the data management plan of 5.1 lid2h Primary data will be stored in a biorepository, available for future research. Organoid read-outs and (adapted) gene expression data will be stored at the High-performance computer data storage facility of 5.1 lid2h that performs automated data back-up. Data handling for publications is recorded in lab journals that are kept for 5 years after publication of the manuscript.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

As we are interested in the effects of age on cultured organoids, we focus on three critical timepoints in the life of the slaughter pig, namely week(s) 1, 4, and 11. Week 1 represents the neonatal phase, week 4 the early post-weaning phase, and week 11 the growth phase. Furthermore, these life stages are known to bypass physiological changes in health and metabolism that support the growth performance.

As there is no clear evidence in pig scientific literature on the effects of sex on the organoid culture system, we chose to mix both sexes equally.

In our proposal, we intend to use transcriptomics as a read out to determine the age effect. We could not find any published literature that have estimated the number of pigs required to find significant differences between gene expression profiles of cultured organoids. We performed a two-sided power analyses, with a significance level of 0.05, and a power of 90%, and 10 pigs per sex per time-point, resulting in an effect size of 1.53. This means that differences greater than 1.53 in gene expression between comparisons are considered significant. We assume that 10 male and 10 female pigs at each timepoint is sufficient to examine the age effect.

3.4.3 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	Description animal procedures



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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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 <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Description animal procedures

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 this proposal, we aim to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material (Ellen et al., 2018; van der Hee et al., 2020) and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as read-out. Although a possible sex-specific effect has been suggested in the scientific literature on humans and rodents, nothing is yet known in pigs, so we will use both female and male animals. To date, information on the effects of age on cultured organoids from pigs is lacking. However, age-dependent moments are important to the feed industry because different nutritional requirements must be met for each life stage. The results of this project will allow researchers and companies in the field of animal husbandry and health to use the in vitro model system as a tool for phenotyping complex traits such as feed efficiency and screening of nutrients.

The project requires the involvement of animal procedures on live pigs. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We do not expect the ante- and post-mortem environment of the pigs on the cultured

organoids. In addition, the organoids will be cultured under antibiotic conditions to prevent any bacterial infections. Pigs of both sexes will be used in equal numbers (n=30 males and 30 females) for sampling. At each time-point, i.e. 1, 4 and 11 weeks of age, we will sacrifice 10 male and 10 female pigs.

For the purpose of this project we will initially focus on pig intestinal tissues. Depending on the techniques developed to produce organoids from the intestine, we will also use tissues from other pig organs, such as liver, respiratory tract, and skeletal muscle, and develop protocols for culturing organoids from these tissues.

As an outlook to this project, we will maximize the use of samples collected from the sacrificed animals by reusing the cultured organoids for various relevant assays, such as 2D and transwell cell culture systems that are relevant for animal nutrition research.

References

- Ellen et al., 2018. Intestinal stem-cell organoids as experimental models to investigate feed efficiency. EAAP annual conference
- Van der Hee et al., 2020. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Frontiers in Cell Development and Biology* 8:375

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

Pigs born in a commercial experimental facility are used to give a good representation of the commercial situation. Pigs will be housed in pens at the same facility to avoid transport-related stress. In accordance with commercial standards, individual body weights are determined at different ages using an electronic scale. Pigs are fed ad libitum. At 1 week, 4 weeks and 11 weeks of age, the pigs are slaughtered. This procedure is carried out by a specialized veterinarian according to "SOPS -00-28-1066 euthanasieren proefdieren". After sacrificing the pig, (tissue) samples are taken from the intestines, liver, organs and tissues of the respiratory tract, skeletal muscles and digesta samples will be collected.

Proposed animal procedures:

- Handling pigs to collect individual body weight
- Sacrificing pigs

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

Researchers have used transcriptomics as a read out to measure the effect of their treatment derived from pig intestinal organoids using at least 7 animals (Khalil et al., 2016; Zhu et al., 2020). In our proposal, we intend to use transcriptomics as a read out to determine the age effect. We could not find any published literature that have estimated the number of pigs required to find significant differences between gene expression profiles of cultured organoids. We performed a two-sided power analyses, with a significance level of 0.05, and a power of 90%, and 10 pigs per sex per time-point, resulting in an effect size of 1.53. This means that differences greater than 1.53 in gene expression between comparisons are considered significant. We assume that 10 male and 10 female pigs at each timepoint is sufficient to examine the age effect.

References

- Khalil et al., 2016. A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell and tissue research* 365: 123-134
- Zhu et al., 2020. L-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. *Food Function* 11: 2714

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	42 - Pigs	Mild	1 week	20	Male and Female		
	42 - Pigs	Mild	4 week	20	Male and Female		
	42 - Pigs	Mild	11 week	20	Male and Female		

Provide justifications for these choices**Species**

The aim of this study is to develop methods for the production of organoids as an in vitro model from tissues of pigs. Therefore, pigs are used in this study.

Origin

The target animals for this experiment are conventional pigs (*Sus scrofa*) from a breed common in the Dutch sector. The piglets are from the same sire and dam line and are housed in a commercial experimental pig facility. The pigs used in this trial will be (family) related.

Life stages

We are interested in the effects of age on cultured organoids and focus on three critical time points in the life of the slaughter pig, namely week(s) 1, 4 and 11. Week 1 represents the neonatal phase, week 4 the early post-weaning phase and week 11 the growth phase. These life stages are known to bridge physiological changes in health and metabolism that support growth performance. In addition, the age-dependent timing is important to the feed industry because different nutritional requirements must be met for each critical life stage.

Number

In total, 60 pigs will be sacrificed. Sacrificing pigs will take place at 1 week (n=20), 4 weeks (n=20) and 11 weeks (n=20) of age

Gender

Both sexes will be equally mixed, because it is unknown if there is an effect of gender on the produced organoids

Genetic alterations

Not applicable

Strain

Not applicable

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to avoid stress. The pig is taken to a separate dissection room where it is euthanized and the appropriate tissue samples are collected. Tissue samples must be collected within 1 hour of sacrifice.

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

Repeated body weight measuring and associated handling may induce stress.

Explain why these effects may emerge.

Stress related to animal handling can result from fear of people, fear of new situations, and fear of leaving group members.

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

Pigs are acclimated to or familiarized with animal handlers to minimize anxiety and stress when handling them. The pigs are approached in a calm manner.

E. 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 F.

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

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Repeated handling of the pigs for body weight measures and using a needle for the injection to euthanize pigs is classified as mild discomfort.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

We aim to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as read-out. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. As the objective required culturing of organoids from the tissues of the target animals to serve as a future in vitro model, an animal-free replacement is not possible.

Reduction

The number of animals was estimated based on power calculations using gene expression as read-out use to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related time points in the life of a slaughter pig. In addition, pigs will be housed and sacrificed at the commercial experimental facility to avoid any transport stress. We will collect other organs of interest, such as liver, organs and tissues from respiratory tract, and skeletal muscle, which will be stored appropriately and can be used for further research upon reasonable request. Cryopreservation of tissue samples and organoids in the proposed biorepository will help reduce the use of animals in experiments for future research.

Refinement

Pigs will be sacrificed before collecting tissue samples. The procedure will be executed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to reduce stress. Pigs will be moved to a separate room where they will be euthanized and tissue samples will be collected.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required. The production and use of organoids as in vitro models is extensively researched for biomedicines in humans and rodents, but also to limited extent in farm animals including pigs (Kar et.al. 2021). In the published scientific literature, we were unable to find information on the effects of breed, sex, and/or age on cultured intestinal organoids of pigs. The objective of this proposal is unique and therefore not repeated.

Reference

Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. Veterinary Research 52: 43.

J. 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 K.

Yes > Describe this establishment.

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

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

In the selected pig facility piglets are born and raised, which prevents stress due to transport. Furthermore, pigs are housed in groups and handling will be done by experienced animal caretakers.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Collection of relevant tissue samples for producing appropriate organoids particularly from (small) intestine, liver, and respiratory tract are not possible without sacrificing the pigs.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to avoid stress. The pigs are taken to a separate dissection room where the euthanasia is performed and the appropriate tissue samples are collected.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Not applicable

Naam van het project	Effect van leeftijd en geslacht op varkens organoïden
NTS-identificatiecode	NTS-NL-925689 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>	nee
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Varkens organoïden in vitro vervanging voor dierproeven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Gastro-intestinaal stelsel met inbegrip van de lever Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding

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).	De doelstelling van het onderzoek is om organoïden gemaakt van weefsel verzameld op verschillende belangrijke momenten in het leven van slachtvarkens te vergelijken met organoïden gemaakt van weefsel verzameld in het slachthuis, waarbij gen expressie gebruikt zal worden om de organoïden te vergelijken. Organoïden zijn cellen die in structuur en functie lijken op kleine mini-orgaantjes, en die ingezet kunnen worden om dieren te fenotyperen en om voer ingrediënten en medicijnen te testen. Hierdoor kan het aantal dierexperimenten vermindert worden.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, 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).	In dit project willen we het effect van de leeftijd van weefsel donoren onderzoeken op geproduceerde organoïden. In veel onderzoek is de leeftijd van dieren belangrijk. Mocht er bij het maken van organoïden geen effect van leeftijd zijn, dan kan er in toekomstig onderzoek slachthuismateriaal gebruikt worden, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. De verwachte opbrengst van het project is een bijdrage aan de inzet van organoïden in onderzoek met landbouwhuisdieren.

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>In dit project zullen we weefsel verzamelen van varkens in het slachthuis en van varkens die op verschillende leeftijden geëuthanaseerd worden. Tijdens het project zullen de varkens in groepen gehuisvest worden waarbij ze op verschillende momenten gewogen worden en individuele voeropname bepaald wordt. De varkens worden geëuthanaseerd. Na het euthanaseren wordt er weefsel van o.a. de darmen, lever, en luchtwegen afgenomen.</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>Varkens zullen gehuisvest worden in commerciële onderzoeksfaciliteiten. Huisvesting zal geen ernstige gevolgen hebben voor dierenwelzijn. De geplande dierhandelingen geven een "licht" ongerief.</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>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</p>
	<p>Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>)</p>	<p>60</p>	<p>0</p>	<p>60</p>	<p>0</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>Hergebruikt</p>		<p>Teruggeplaatst</p>		<p>Geadopteerd</p>
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>De varkens worden geëuthanaseerd voordat weefsel verzameld wordt. Aan levenden dieren kan op dit moment geen weefsel verzameld worden van bepaalde delen van de darmen, de lever en de luchtwegen. Hierdoor dienen de dieren eerst geëuthanaseerd te worden.</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.

Doel is om te onderzoeken of organoïden gemaakt van weefsel verzameld van verschillende leeftijden mestvarkens en organoïden gemaakt van weefsel verzameld uit het slachthuis van elkaar verschillen of overeenkomstig zijn. Hierdoor moeten varkens op verschillende leeftijden geëuthanaseerd worden om weefsel te verzamelen. Dit kan niet worden vervangen door diervrije proeven of door proeven met andere diersoorten.

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.

In dit project worden verschillende projecten gecombineerd die gericht zijn op het gebruik en de toepassing van organoïden in onderzoek dat zich richt op landbouwhuisdieren. Weefsel monsters van verschillende organen (o.a. darmen, lever, luchtwegen, en spieren) worden verzameld van hetzelfde dier, om zo het aantal dieren te reduceren. Deze weefsel monsters zullen nauwkeurig opgeslagen worden, zodat ze voor toekomstig onderzoek ingezet kunnen worden. Varkens die in dit project gebruikt worden zijn niet betrokken geweest bij andere experimenten. Daarnaast worden alleen standaard metingen toegepast zoals het meten van lichaamsgewicht en individuele voeropname. Het aantal dieren is gebaseerd op basis van power berekeningen en op basis van kennis van voorgaande experimenten waarbij organoïden zijn gebruikt om verschillen aan te tonen tussen dieren. In dit project zullen alle weefsel monsters en organoïden opgeslagen worden in een bio-bank voor toekomstig onderzoek.

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.

Voordat weefsel verzameld wordt, worden de varkens geëuthanaseerd. Het euthanaseren van varkens zal uitgevoerd worden door een ervaren dierenarts of een gecertificeerd dierversorger om de stress die de varkens ervaren te minimaliseren. De dierversorger zullen de dieren tijdens de handelingen rustig benaderen. De varkens worden verplaatst naar een aparte ruimte waar ze geëuthanaseerd worden en het weefsel verzameld wordt. Het weefsel wordt binnen een uur na euthanaseren verzameld. Er is geen verdere verfijning mogelijk.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

In dit project worden varkens gebruikt, omdat we al ervaring hebben met het maken van varkens organoïden. De varkens zullen geëuthanaseerd worden op een leeftijd van 1, 4 en 11 weken om weefsel en darmverteringsmonsters te verzamelen. Er is voor deze leeftijd gekozen omdat er rondom deze leeftijden veranderingen plaatsvinden in het functioneren van de darmen door veranderingen in voeding (week 4, spenen) en huisvesting (week 11 worden varkens vaak verhuisd naar een andere locatie). Verder zijn varkens vanaf ongeveer 11 weken immunologisch volwassen. Daarnaast zullen we weefsel in het slachthuis verzamelen.

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 22 september 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115276

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model
Aanvraagnummer: AVD202115276
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst omdat het een eenvoudige aanvraag betreft.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Vragen over de NTS</p> <p>In de NTS komt de term 'geëuthanaseerd/euthanaseren' meerdere ke¹n voor. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik, Kunt u deze term  aanpassen?</p> <p>Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit  aanpassen in uw NTS? ²</p> <p>Vragen over Bijlage 3.4.3.1  ³</p> <p>In het kader van het verminderen van het aantal dierproeven vroeg de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Door eerst te beginnen met de jongste groep dieren (1 week) en hier go/no-go criteria aan te koppelen, kan  ellicht ⁴ met een lager aantal proefdieren het doel bereikt worden.  ⁵  ⁶</p> <p>Vragen over het aanvraagformulier</p> <p>De gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Bent u akkoord met het aanpassen van de termijn, met inacht⁷eming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026 </p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Description animal procedures ⁸				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	9/T 	60	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn

Overzicht van opmerkingen bij 10. AdviesNotaCCD_d.d. 22-09-2021_met opmerkingen.pdf

Pagina: 2

-
- Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 15:33:02
5.2 lid1 kun je er bijzetten fo ze het kunnen aanpassen in doden.
-
- Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:06:09
Het is voor mij uit de NTS onduidelijk waarom er individuele voerafnamen bepaald wordt. Ze moeten dit of uit de NTS halen, of uitleggen waarom ze dit doen.
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:06:33
Nu ik de bijlage lees zie ik dat ze dat niet meer gaan doen. Dus uit de NTS laten halen.
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:10:34
5.1 lid2e "Consistent maken"
-
- Nummer: 3 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:06:42
Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven zodat helder wordt waar de bijlage om gaat? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:10:23
5.1 lid2e Vragen of 1e titel aangehouden kan worden
-
- Nummer: 4 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:10:57
Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go- no go moment wordt opgenomen?
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:10:14
5.1 lid2e "bijvoorbeeld door trapsgewijs includeren..."
-
- Nummer: 5 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:00:02
U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële houderij. Bij punt C van de bijlage zegt u echter dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de richtlijn. Kunt u punt C in de bijlage dierproeven aanpassen?
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:16:46
5.1 lid2e "U geeft in bijlage aan dat de dieren gehuisvest worden bij de veehouderij, interpreteren wij dit goed dat de richtlijnen niet worden nagevolgd? Zo ja, noemen bij C."
-
- Nummer: 6 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:23:35
U spreekt in de bijlage dierproeven over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. De CCD wilt echter weten of u een methode gebruikt, zoals aangeven in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Kunt u punt aanvullen?
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:17:51
5.1 lid2e welke methode?
-
- Nummer: 7 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:01:01
5.2 lid1
- ↳ Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:18:57
5.1 lid2e "Nu over termijn heen.. Wilt u dat we dit aanpassen?"
-
- Nummer: 8 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:01:14
Mag weg
-
- Nummer: 9 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Highlight Datum: 22-9-2021 16:01:09

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Description animal procedures

Citaat:

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

²Citaat:

In the selected pig facility piglets are born and raised, which prevents stress due to transport. Furthermore, pigs are housed in groups and handling will be done by experienced animal caretakers.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Description animal procedures

Varkens (Sus scrofa domesticus)


Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.


Locatie uitvoering experimenten	- Niet alle proeven vinden plaats ³ in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht. - Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.
--	--


2 DEC advies


DEC-advies	<p>Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"><input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)<input type="checkbox"/> Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g) <p>De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden betrokken van een commerciële onderzoeksfaciliteiten waar ze onder reguliere omstandigheden, in groepshuisvesting, gehouden worden.</p> <p>Citaat C15: De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Na vragen van de DEC hierover heeft de onderzoeker de aantallen dieren aangepast. De DEC is van mening dat er nu een realistisch aantal dieren gebruikt wordt. De DEC vraagt zich wel</p>
-------------------	--


Pagina: 3

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2h Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:01:49
Mag van mij weg.

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-9-2021 16:01:37

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:02:28
Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.

 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:17:00
Checken of dit goed staat

 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 11:42:02
Weglaten

af of trapsgewijs uitvoeren (met go/no go's) van het project o.b.v. leeftijd van de dieren (starten met de jongste dieren omdat deze het meest afwijken van slachtleeftijd) een optie is om het aantal dieren in het onderzoek te verminderen.

Citaat C21:

De NTS is naar het oordeel van de DEC begrijpelijk geformuleerd, maar niet op alle punten aangepast n.a.v. de vragen die de DEC gesteld heeft en in om die reden niet meer op alle punten (o.a. beide geslachten) een goede afspiegeling van het aangepaste project.

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het directe doel van het project, het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal verzameld op verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van mannelijke en vrouwelijke slachtvarkens, het lichte ongerief en de aantasting van de integriteit van 60 proefdieren?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan de inzet van organoïden als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen te bestuderen.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren in dit project ervaren licht ongerief. De integriteit van de dieren wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert dit als een groot belang van grote morele waarde.
- Echter, hier tegenover staan toekomstige proefdieren. Wanneer organoïden ingezet kunnen worden dan zijn minder proefdieren nodig in de toekomst. De DEC waardeert dit ook als een groot belang van grote morele waarde.
- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een belang van geringe morele waarde ziet.
- De humane en dierlijke patiënten kunnen in de toekomst belang hebben bij de resultaten van dit onderzoek wanneer het model met organoïden

ingezet kan worden voor testen en ontwikkelen van behandelmethoden. De DEC waardeert dit als een reëel belang van geringe morele waarde.

- De farmaceutische industrie heeft een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

- Ook de (dier)voedingsindustrie heeft in de ogen van de DEC een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

De DEC heeft gediscussieerd of de laatste 3 belanghebbenden niet heel ver in de toekomst liggen. De onderzoeker noemt ze wel maar de DEC is van mening dat dat voor dit project nog niet aan de orde zal zijn en dat het doel van dit project zal zijn om een model te ontwikkelen en te kijken of dat model geschikt is. Om die reden geeft de DEC aan de laatste 3 belanghebbenden, in deze fase van ontwikkeling, een geringe morele waarde.

3.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuis materiaal en materiaal verzameld van levende slachtvarkens t.b.v. het ontwikkelen van een model met organoïden met maximaal licht ongerief voor maximaal 60 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat D3:

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelvingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen. De [1] had graag het minderheidsstandpunt apart benoemd zien worden bij E2 van uw advies. 5.2 lid1 [3]

4 Inhoudelijke beoordeling

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.

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

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Description animal procedures	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Description animal procedures	Er worden geen humane eindpunten verwacht.	
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	

5 Samenvatting








5.2 lid1

[6] is sprake van dieren die niet zijn gefokt voor dierproeven en de dieren worden gehouden op een locatie buiten de vergunninghouder. 5.2 lid1

5.2 lid1

[7] e dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de

Pagina: 6

-
-  Nummer: 1 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 15:49:23
De CCD waardeert het dat u het minderheidsstandpunt in uw advies benoemt, ze had dit graag bij E2 apart benoemd zien worden.
-
-  Nummer: 2 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Highlight Datum: 22-9-2021 15:41:54
5.2 lid1
- Ik zou er zeker bij zetten, u geeft bij C21 aan dat de NTS niet alle punten een goede afspiegeling van het aangepaste project is. De CCD had graag een NTS gezien waarbij dit wel het geval was.
-
-  Nummer: 3 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 15:48:24
Naar aanleiding van vragen van de DEC heeft de aanvrager het doel in haar huidige aanvraag aangepast. De CCD ziet dat er veel onderdelen uit het originele doel zijn verdwenen, waardoor het uiteindelijke doel helder en navolgbaar is. De CCD snapt dat de DEC vragen over het oorspronkelijke doel had. Ze verzoekt de echter DEC om bij toekomstige aanvragen, bij het aanpassen van de doelstelling, de aanvrager een nieuwe aanvraag bij de CCD te laten indienen. Hierdoor wordt de onafhankelijkheid van de DEC gewaarborgd en kan er geen blijf van zijn dat de DEC meeschrijft aan een aanvraag.
-
-  Nummer: 4 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:07:26
Dit onderzoek richt zich op de ontwikkeling van organoids. Dit kan in de toekomst een vermindering in het gebruik van proefdieren opleveren.
-
-  Nummer: 5 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:02:56
Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.
-
-  Nummer: 6 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Highlight Datum: 22-9-2021 16:02:54
-
-  Nummer: 7 Auteur: **5.1 lid2e** Onderwerp: Highlight Datum: 22-9-2021 16:03:27
-

²sen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden op een locatie buiten de vergunninghouder onder reguliere omstandigheden gehuisvest.



¹



³


6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning


5.2 lid 1


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

Pagina: 7

 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:03:43
Heb je hierboven al getackeld.

 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Highlight Datum: 22-9-2021 16:03:21

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2h Onderwerp: Sticky Note Datum: 22-9-2021 16:13:03

Het advies van de DEC is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of een go- no go moment niet bijdraagt aan vermindering van de dieren. Het Secretariaat heeft aan de aanvrager gevraagd te onderbouwen of met toevoegen van dit go- no go moment de doelstelling van het project nog behaald kan worden.



Advies aan CCD

Datum 23 september 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115276

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model
 Aanvraagnummer: AVD202115276
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst omdat het een eenvoudige aanvraag betreft.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Vragen over de NTS</p> <p>In de NTS komt de term 'geëthanaseerd/euthanaseren' meerdere keren voor. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u deze term aanpassen in 'gedood/doden'??</p> <p>Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit aanpassen in uw NTS?</p> <p>In de NTS wordt vermeld dat individuele voerinname wordt bepaald. Dit blijkt niet uit de bijlage. Kunt u dit aanpassen in de NTS?</p> <p>Vragen over Bijlage 3.4.3.1</p> <p>In het kader van het verminderen van het aantal dierproeven vóór de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Door eerst te beginnen met de jongste groep dieren (1 week) en hier go/no-go criteria aan te koppelen, kan wellicht met een lager aantal proefdieren het doel bereikt worden. Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go/no-go moment wordt opgenomen?</p>
	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>

Overzicht van opmerkingen bij 12. AdviesNotaCCD_1, d.d. 23-09-2021_met opmerkingen.pdf

Pagina: 1

-  Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:44:28
Of dus in de aanvraag. Hoe weet je welke correct is?
-
-  Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:45:47
vraagt
-
-  Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:46:39
of misschien wat algemener stellen: kunt u aangeven of go-no go momenten kunnen worden geïncludeerd, en zo nee, waarom niet?
-  Auteurs: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:46:56
Maar dat is net effe een andere manier van vraag stellen, jouw ding is niet fout.
-
-  Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 23-9-2021 10:46:06
-

	<p>Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven zodat helder wordt waar de bijlage om gaat? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële houderij. Bij punt C van de bijlage zegt u echter dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens de richtlijn. Kunt u punt C in de bijlage dierproeven aanpassen?</p> <p>U spreekt in de bijlage dierproeven bij punt K over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. CCD wilt echter weten of u een methode gebruikt, zoals aangeven in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Kunt u dit punt aanvullen?</p> <p>Vragen over het aanvraagformulier</p> <p>De gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Bent u akkoord met het aanpassen van de termijn, met inachtneming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026?</p>			
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Description animal procedures				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		60	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Description animal procedures

Citaat:

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.


Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren


3.4.3.1 Description animal procedures


Varkens (Sus scrofa domesticus)


Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Pagina: 2


 Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:47:23
ik zou hier dus effe verwijzen naar die handreiking waar 5.1 lid2e het over had.


 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 13:10:39
Vraag anders gesteld


 Nummer: 2 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:49:05
Dit hoeft elkaar niet tegen te spreken. 5.2 lid1


 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:52:38

En overigens, de enige handeling is het doden van de dieren, dus op het moment dat ze proefdier worden, zitten ze niet meer in die commerciële stal....dus wat mij betreft hoef je deze vraag niet te stellen.

 Nummer: 3 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 23-9-2021 10:53:25

 Nummer: 4 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:54:18
Ze hebben op deze vraag al aangevuld dat ze dit zullen doen volgens de richtlijn, dus deze vraag is niet correct gesteld. Je wilt weten welke methode ze zullen gebruiken.

 Nummer: 5 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:55:29
ik zou de vraag stellen als een servicemelding van ons dat de vergunning later zou kunnen ingaan. Nu kan het worden opgevat dat wij een looptijd gaan opleggen aan ze, terwijl wij hier niks van mogen vinden.

 Nummer: 6 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Markering Datum: 23-9-2021 10:54:37

Locatie uitvoering experimenten	<p>- Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht.</p> <p>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</p>
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) <input type="checkbox"/> Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g) <p>De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden betrokken van een commerciële onderzoeksfaciliteiten waar ze onder reguliere omstandigheden, in groepshuisvesting, gehouden worden.</p> <p>Citaat C15: De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Na vragen van de DEC hierover heeft de onderzoeker de aantallen dieren aangepast. De DEC is van mening dat er nu een realistisch aantal dieren gebruikt wordt. De DEC vraagt zich wel af of trapsgewijs uitvoeren (met go/no go's) van het project o.b.v. leeftijd van de dieren (starten met de jongste dieren omdat deze het meest afwijken van slachtleeftijd) een optie is om het aantal dieren in het onderzoek te verminderen.</p> <p>Citaat C21: De NTS is naar het oordeel van de DEC begrijpelijk geformuleerd, maar niet op alle punten aangepast n.a.v. de vragen die de DEC gesteld heeft en in om die reden niet meer op alle punten (o.a. beide geslachten) een goede afspiegeling van het aangepaste project.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat D: 1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het directe doel van het project, het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuis materiaal en materiaal verzameld op verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van mannelijke</p>
-------------------	---

en vrouwelijke slachtvarkens, het lichte ongerief en de aantasting van de integriteit van 60 proefdieren?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan de inzet van organoïden als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen te bestuderen.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren in dit project ervaren licht ongerief. De integriteit van de dieren wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert dit als een groot belang van grote morele waarde.
 - Echter, hier tegenover staan toekomstige proefdieren. Wanneer organoïden ingezet kunnen worden dan zijn minder proefdieren nodig in de toekomst. De DEC waardeert dit ook als een groot belang van grote morele waarde.
 - De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
 - De CRO heeft, omdat dit contract-research onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een belang van geringe morele waarde ziet.
 - De humane en dierlijke patiënten kunnen in de toekomst belang hebben bij de resultaten van dit onderzoek wanneer het model met organoïden ingezet kan worden voor testen en ontwikkelen van behandelmethoden. De DEC waardeert dit als een reëel belang van geringe morele waarde.
 - De farmaceutische industrie heeft een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.
 - Ook de (dier)voedingsindustrie heeft in de ogen van de DEC een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.
- De DEC heeft gediscussieerd of de laatste 3 belanghebbenden niet heel ver in de toekomst liggen. De onderzoeker noemt ze wel maar de DEC is van mening dat dat voor dit project nog niet aan de orde zal zijn en dat het doel van dit project zal zijn om een model te ontwikkelen en te kijken of dat model geschikt is. Om die reden geeft de DEC aan de laatste 3 belanghebbenden, in deze fase van ontwikkeling, een geringe morele waarde.

3.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal

verzameld van levende slachtvarkens t.b.v. het ontwikkelen van een model met organoïden met maximaal licht ongerief voor maximaal 60 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat D3:

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het dat u het minderheidsstandpunt in uw advies benoemt, ze had dit graag bij E2 apart benoemd zien worden.</p> <p>U geeft bij C21 van uw advies aan dat de NTS niet op alle punten een goede afspiegeling van het aangepaste project is. De CCD had graag een NTS gezien waarbij dit wel het geval was.</p> <p>Naar aanleiding van vragen van de DEC heeft de aanvrager het doel in haar huidige aanvraag aangepast. De CCD ziet dat er veel onderdelen uit het originele doel zijn verdwenen, waardoor het uiteindelijke doel helder en navolgbaar is. De CCD snapt dat de DEC vragen over het oorspronkelijke doel had. Echter, de CCD verzoekt de DEC om bij toekomstige aanvragen, bij het aanpassen van de doelstelling, de aanvrager een nieuwe aanvraag bij de CCD te laten indienen. Hierdoor wordt de onafhankelijkheid van de DEC gewaarborgd en kan er geen blijk van zijn dat de DEC meeschrijft aan een aanvraag.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.

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

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Description animal procedures	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Description animal procedures	Er worden geen humane eindpunten verwacht.	
Varkens (Sus scrofa domestica)	Ongerief: 100,0% Licht	

Opmerkingen over de dierproeven

Naam proef	Opmerkingen
3.4.3.1 Description animal procedures	Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.

5 Samenvatting

5.2 lid1

Dit onderzoek richt zich op de ontwikkeling van organoids. Dit kan in de toekomst een vermindering in het gebruik van proefdieren opleveren.

Er is sprake van dieren die niet zijn gefokt voor dierproeven en de dieren worden gehouden op een locatie buiten de vergunninghouder. Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting. **5.2 lid1**
5.2 lid1

Het advies van de DEC is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of een go/no-go moment niet bijdraagt aan vermindering van de dieren. Het Secretariaat heeft aan de aanvrager gevraagd te onderbouwen of met toevoegen van dit go- no go moment de doelstelling van het project nog behaald kan worden.

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

Nummer: 1 Auteur: 5.1 lid2e Onderwerp: Notitie Datum: 23-9-2021 10:57:19

We hebben hier nog een speciale opmerking voor over aanmelding bij de NVWA (zie documenten met standaard teksten). Die zou ik er dan effe bijzetten.



Advies aan CCD

Datum 24 september 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115276

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model
Aanvraagnummer: AVD202115276
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst omdat het een eenvoudige aanvraag betreft.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Vragen over de NTS</p> <p>In de NTS komt de term 'geëthanaseerd/euthanaseren' meerdere keren voor. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u deze term aanpassen in 'gedood/doden'?</p> <p>Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit aanpassen in uw NTS?</p> <p>In de NTS wordt vermeld dat individuele voerinname wordt bepaald. Dit blijkt niet uit de bijlage. Kunt u dit consistent maken?</p> <p>Vragen over Bijlage 3.4.3.1</p> <p>In het kader van het verminderen van het aantal proefdieren vraagt de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u, bijvoorbeeld, trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go/no-go moment wordt opgenomen?</p> <p>Bij de aan de DEC aangeboden stukken ontbreekt de titel van de bijlage</p>
---------------	--

<p>dierproeven. Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op commerciële veehouderij. Interpreteren wij het goed dat de richtlijnen voor huisvesting hiermee niet worden nagevolgd? Zo ja, kunt u dit noemen bij C van de bijlage dierproeven?</p> <p>U spreekt in de bijlage dierproeven bij punt K over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. De CCD wil echter weten welke methode u gebruikt. Kunt u dit punt aanvullen?</p> <p>Vragen over het aanvraagformulier</p> <p>De door u gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Wilt u dat we uw termijn aanpassen, met inachtneming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026? Zo niet, dan houdt de CCD de termijnen aan die genoemd zijn in het aanvraagformulier.</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Description animal procedures				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		60	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Description animal procedures

Citaat:

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Description animal procedures

Varkens (Sus scrofa domesticus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	<p>- Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht.</p> <p>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</p>
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) <input type="checkbox"/> Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g) <p>De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden betrokken van een commerciële onderzoeksfaciliteiten waar ze onder reguliere omstandigheden, in groepshuisvesting, gehouden worden.</p> <p>Citaat C15: De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Na vragen van de DEC hierover heeft de onderzoeker de aantallen dieren aangepast. De DEC is van mening dat er nu een realistisch aantal dieren gebruikt wordt. De DEC vraagt zich wel af of trapsgewijs uitvoeren (met go/no go's) van het project o.b.v. leeftijd van de dieren (starten met de jongste dieren omdat deze het meest afwijken van slachtleeftijd) een optie is om het aantal dieren in het onderzoek te verminderen.</p> <p>Citaat C21: De NTS is naar het oordeel van de DEC begrijpelijk geformuleerd, maar niet op alle punten aangepast n.a.v. de vragen die de DEC gesteld heeft en in om die reden niet meer op alle punten (o.a. beide geslachten) een goede afspiegeling van het aangepaste project.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat D: 1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het directe doel van het project, het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal verzameld op verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van mannelijke</p>
-------------------	--

en vrouwelijke slachtvarkens, het lichte ongerief en de aantasting van de integriteit van 60 proefdieren?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan de inzet van organoïden als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen te bestuderen.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren in dit project ervaren licht ongerief. De integriteit van de dieren wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert dit als een groot belang van grote morele waarde.
- Echter, hier tegenover staan toekomstige proefdieren. Wanneer organoïden ingezet kunnen worden dan zijn minder proefdieren nodig in de toekomst. De DEC waardeert dit ook als een groot belang van grote morele waarde.
- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een belang van geringe morele waarde ziet.
- De humane en dierlijke patiënten kunnen in de toekomst belang hebben bij de resultaten van dit onderzoek wanneer het model met organoïden ingezet kan worden voor testen en ontwikkelen van behandelmethoden. De DEC waardeert dit als een reëel belang van geringe morele waarde.
- De farmaceutische industrie heeft een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.
- Ook de (dier)voedingsindustrie heeft in de ogen van de DEC een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

De DEC heeft gediscussieerd of de laatste 3 belanghebbenden niet heel ver in de toekomst liggen. De onderzoeker noemt ze wel maar de DEC is van mening dat dat voor dit project nog niet aan de orde zal zijn en dat het doel van dit project zal zijn om een model te ontwikkelen en te kijken of dat model geschikt is. Om die reden geeft de DEC aan de laatste 3 belanghebbenden, in deze fase van ontwikkeling, een geringe morele waarde.

3.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal

verzameld van levende slachtvarkens t.b.v. het ontwikkelen van een model met organoïden met maximaal licht ongerief voor maximaal 60 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat D3:

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het dat u het minderheidsstandpunt in uw advies benoemt, ze had dit graag bij E2 apart benoemd zien worden.</p> <p>U geeft bij C21 van uw advies aan dat de NTS niet op alle punten een goede afspiegeling van het aangepaste project is. De CCD had graag een NTS gezien waarbij dit wel het geval was.</p> <p>Naar aanleiding van vragen van de DEC heeft de aanvrager het doel in haar huidige aanvraag aangepast. De CCD ziet dat er veel onderdelen uit het originele doel zijn verdwenen, waardoor het uiteindelijke doel helder en navolgbaar is. De CCD snapt dat de DEC vragen over het oorspronkelijke doel had. Echter, de CCD verzoekt de DEC om bij toekomstige aanvragen, bij het aanpassen van de doelstelling, de aanvrager een nieuwe aanvraag bij de CCD te laten indienen. Hierdoor wordt de onafhankelijkheid van de DEC gewaarborgd en kan er geen blijk van zijn dat de DEC meeschrijft aan een aanvraag.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

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

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Description animal procedures	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Description animal procedures	Er worden geen humane eindpunten verwacht.	
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	

Opmerkingen over de dierproeven

Naam proef	Opmerkingen
3.4.3.1 Description animal procedures	Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.

5 Samenvatting

5.2 lid1

[Redacted text]

Dit onderzoek richt zich op de ontwikkeling van organoids. Dit kan in de toekomst een vermindering in het gebruik van proefdieren opleveren.

Er is sprake van dieren die niet zijn gefokt voor dierproeven en de dieren worden gehouden op een locatie buiten de vergunninghouder. Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting. 5.2 lid1

[Redacted text]

Het advies van de DEC is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of een go/no-go moment niet bijdraagt aan vermindering van de dieren. Het Secretariaat heeft aan de aanvrager gevraagd te onderbouwen of met toevoegen van dit go- no go moment de doelstelling van het project nog behaald kan worden.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

[Redacted text]

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: donderdag 23 september 2021 13:15
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202115276

Geachte 5.1 lid2e

Op 03-08-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115276. 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

In de NTS komt de term 'geëthanaseerd/euthanaseren' meerdere keren voor. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u deze term aanpassen in 'gedood/doden'?

Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit aanpassen in uw NTS?

In de NTS wordt vermeld dat individuele voeriname wordt bepaald. Dit blijkt niet uit de bijlage. Kunt u dit consistent maken?

Onduidelijkheden

In het kader van het verminderen van het aantal proefdieren vraagt de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u, bijvoorbeeld, trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go/no-go moment wordt opgenomen?

Bij de aan de DEC aangeboden stukken ontbreekt de titel van de bijlage dierproeven. Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?

U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op commerciële veehouderij. Interpreteren wij het goed dat de richtlijnen voor huisvesting hiermee niet worden nagevolgd? Zo ja, kunt u dit noemen bij C van de bijlage dierproeven?

U spreekt in de bijlage dierproeven bij punt K over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. De CCD wil echter weten welke methode u gebruikt. Kunt u dit punt aanvullen?

De door u gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Wilt u dat we uw termijn aanpassen, met inachtneming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026? Zo niet, dan houdt de CCD de termijnen aan die genoemd zijn in het aanvraagformulier.

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

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Geachte **5.1 lid2e**

Op 03-08-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD **5.1 lid2e, 5.1 lid** 202115276. 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

In de NTS komt de term 'geëuthanaseerd/euthanaseren' meerdere keren voor. De CCD vindt dit verullend taalgebruik. Kunt u deze term aanpassen in 'gedood/doden'? – **we hebben dit aangepast in de NTS**

Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit aanpassen in uw NTS?

We hebben dit aangepast:

In dit project willen we het effect van de leeftijden het effect van geslacht van weefsel donoren onderzoeken op geproduceerde organoïden. In veel onderzoek is de leeftijd en het geslacht van dieren belangrijk. Mocht er bij het maken van organoïden geen effect van leeftijd zijn, dan kan er in toekomstig onderzoek slachthuismateriaal gebruikt worden, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. Daarnaast willen we onderzoeken of er een effect van het geslacht van weefsel donoren is op de geproduceerde organoïden. Mocht er geen effect van geslacht zijn, dan kan in toekomstig onderzoek gewerkt worden met 1 geslacht, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. De verwachte opbrengst van het project is een bijdrage aan de inzet van organoïden in onderzoek met landbouwhuisdieren.

In de NTS wordt vermeld dat individuele voerinnamen worden bepaald. Dit blijkt niet uit de bijlage. Kunt u dit consistent maken?

We hebben dit aangepast in de bijlage.

Onduidelijkheden

In het kader van het verminderen van het aantal proefdieren vraagt de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u, bijvoorbeeld, trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go/no-go moment wordt opgenomen?

Het is lastig om een go/no-go moment op te nemen, omdat de weefsel monsters verzameld worden en later opgroeien tot organoïden. Door het op te splitsen is het lastig om familie verbanden mee te nemen.

Bij de aan de DEC aangeboden stukken ontbreekt de titel van de bijlage dierproeven. Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?

We hebben dit aangepast in het word document

U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op commerciële veehouderij. Interpreteren wij het goed dat de richtlijnen voor huisvesting hiermee niet worden nagevolgd? Zo ja, kunt u dit noemen bij C van de bijlage dierproeven?

De dieren worden gehuisvest op een commercieel onderzoeksbedrijf. Dit onderzoeksbedrijf volgt de richtlijnen genoemd in Annex III of the Directive 2010/63/EU. We hebben dit toegevoegd in de bijlage.

U spreekt in de bijlage dierproeven bij punt K over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. De CCD wil echter weten welke methode u gebruikt. Kunt u dit punt aanvullen?

In de bijlage hebben we de volgende tekst toegevoegd:

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". Briefly, the pigs will be carried from their rearing pen to a separate dissection room after injecting sedating agents like Stresnil® or combination of Zoletil + Xylazine, inter muscularly to reduce any stress. Thereafter, Euthasol® will be injected intravenously and after achieving the anesthetic action the pigs will be bled to complete the euthanasia process. The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker. Thereafter, appropriate tissue samples will be collected.

De door u gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Wilt u dat we uw termijn aanpassen, met inachtneming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026? Zo niet, dan houdt de CCD de termijnen aan die genoemd zijn in het aanvraagformulier.

Prima om dit aan te passen

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.



Centrale Commissie Dierproeven

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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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 <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Description animal procedures

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 this proposal, we aim to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material (Ellen et al., 2018; van der Hee et al., 2020) and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as read-out. Although a possible sex-specific effect has been suggested in the scientific literature on humans and rodents, nothing is yet known in pigs, so we will use both female and male animals. To date, information on the effects of age on cultured organoids from pigs is lacking. However, age-dependent moments are important to the feed industry because different nutritional requirements must be met for each life stage. The results of this project will allow researchers and companies in the field of animal husbandry and health to use the in vitro model system as a tool for phenotyping complex traits such as feed efficiency and screening of nutrients.

The project requires the involvement of animal procedures on live pigs. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We do not expect the ante- and post-mortem environment of the pigs on the cultured

organoids. In addition, the organoids will be cultured under antibiotic conditions to prevent any bacterial infections. Pigs of both sexes will be used in equal numbers (n=30 males and 30 females) for sampling. At each time-point, i.e. 1, 4 and 11 weeks of age, we will sacrifice 10 male and 10 female pigs.

For the purpose of this project we will initially focus on pig intestinal tissues. Depending on the techniques developed to produce organoids from the intestine, we will also use tissues from other pig organs, such as liver, respiratory tract, and skeletal muscle, and develop protocols for culturing organoids from these tissues.

As an outlook to this project, we will maximize the use of samples collected from the sacrificed animals by reusing the cultured organoids for various relevant assays, such as 2D and transwell cell culture systems that are relevant for animal nutrition research.

References

- Ellen et al., 2018. Intestinal stem-cell organoids as experimental models to investigate feed efficiency. EAAP annual conference
- Van der Hee et al., 2020. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Frontiers in Cell Development and Biology* 8:375

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

Pigs born in a commercial experimental facility are used to give a good representation of the commercial situation. Pigs will be housed in pens at the same facility to avoid transport-related stress. In accordance with commercial standards, individual body weights are determined at different ages using an electronic scale. Furthermore, pigs will be housed in pens where individual feed intake can be collected. Pigs are fed ad libitum. At 1 week, 4 weeks and 11 weeks of age, the pigs are slaughtered. This procedure is carried out by a specialized veterinarian according to "SOPS -00-28-1066 euthanasieren proefdieren". After sacrificing the pig, (tissue) samples are taken from the intestines, liver, organs and tissues of the respiratory tract, skeletal muscles and digesta samples will be collected.

Proposed animal procedures:

- Handling pigs to collect individual body weight
- Pen with individual feeding stations
- Sacrificing pigs

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

Researchers have used transcriptomics as a read out to measure the effect of their treatment derived from pig intestinal organoids using at least 7 animals (Khalil et al., 2016; Zhu et al., 2020). In our proposal, we intend to use transcriptomics as a read out to determine the age effect. We could not find any published literature that have estimated the number of pigs required to find significant differences between gene expression profiles of cultured organoids. We performed a two-sided power analyses, with a significance level of 0.05, and a power of 90%, and 10 pigs per sex per time-point, resulting in an effect size of 1.53. This means that differences greater than 1.53 in gene expression between comparisons are considered significant. We assume that 10 male and 10 female pigs at each timepoint is sufficient to examine the age effect.

References

- Khalil et al., 2016. A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell and tissue research* 365: 123-134
- Zhu et al., 2020. L-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. *Food Function* 11: 2714

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	42 - Pigs	Mild	1 week	20	Male and Female		
	42 - Pigs	Mild	4 week	20	Male and Female		
	42 - Pigs	Mild	11 week	20	Male and Female		

Provide justifications for these choices**Species**

The aim of this study is to develop methods for the production of organoids as an in vitro model from tissues of pigs. Therefore, pigs are used in this study.

Origin

The target animals for this experiment are conventional pigs (*Sus scrofa*) from a breed common in the Dutch sector. The piglets are from the same sire and dam line and are housed in a commercial experimental pig facility. The pigs used in this trial will be (family) related.

Life stages

We are interested in the effects of age on cultured organoids and focus on three critical time points in the life of the slaughter pig, namely week(s) 1, 4 and 11. Week 1 represents the neonatal phase, week 4 the early post-weaning phase and week 11 the growth phase. These life stages are known to bridge physiological changes in health and metabolism that support growth performance. In addition, the age-dependent timing is important to the feed industry because different nutritional requirements must be met for each critical life stage.

Number

In total, 60 pigs will be sacrificed. Sacrificing pigs will take place at 1 week (n=20), 4 weeks (n=20) and 11 weeks (n=20) of age

Gender

Both sexes will be equally mixed, because it is unknown if there is an effect of gender on the produced organoids

Genetic alterations

Not applicable

Strain

Not applicable

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". Briefly, the pigs will be carried from their rearing pen to a separate dissection room after injecting sedating agents like Stresnil® or combination of Zoletil + Xylazine, inter muscularly to reduce any stress. Thereafter, Euthasol® will be injected intravenously and after achieving the anesthetic action the pigs will be bled to complete the euthanasia process. The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker. Thereafter, appropriate tissue samples will be collected.

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

Repeated body weight measuring and associated handling may induce stress.

Explain why these effects may emerge.

Stress related to animal handling can result from fear of people, fear of new situations, and fear of leaving group members.

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

Pigs are acclimated to or familiarized with animal handlers to minimize anxiety and stress when handling them. The pigs are approached in a calm manner.

E. 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 F.

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

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Repeated handling of the pigs for body weight measures and using a needle for the injection to euthanize pigs is classified as mild discomfort.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

We aim to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as read-out. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. As the objective required culturing of organoids from the tissues of the target animals to serve as a future in vitro model, an animal-free replacement is not possible.

Reduction

The number of animals was estimated based on power calculations using gene expression as read-out use to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related time points in the life of a slaughter pig. In addition, pigs will be housed and sacrificed at the commercial experimental facility to avoid any transport stress. We will collect other organs of interest, such as liver, organs and tissues from respiratory tract, and skeletal muscle, which will be stored appropriately and can be used for further research upon reasonable request. Cryopreservation of tissue samples and organoids in the proposed biorepository will help reduce the use of animals in experiments for future research.

Refinement

Pigs will be sacrificed before collecting tissue samples. The procedure will be executed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to reduce stress. Pigs will be moved to a separate room where they will be euthanized and tissue samples will be collected.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required. The production and use of organoids as in vitro models is extensively researched for biomedicines in humans and rodents, but also to limited extent in farm animals including pigs (Kar et.al. 2021). In the published scientific literature, we were unable to find information on the effects of breed, sex, and/or age on cultured intestinal organoids of pigs. The objective of this proposal is unique and therefore not repeated.

Reference

Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. Veterinary Research 52: 43.

J. 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 K.

Yes > Describe this establishment.

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

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

In the selected pig facility piglets are born and raised, which prevents stress due to transport. Furthermore, pigs are housed in groups and handling will be done by experienced animal caretakers.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Collection of relevant tissue samples for producing appropriate organoids particularly from (small) intestine, liver, and respiratory tract are not possible without sacrificing the pigs.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". Briefly, the pigs will be carried from their rearing pen to a separate dissection room after injecting sedating agents like Stresnil® or combination of Zoletil + Xylazine, inter muscularly to reduce any stress. Thereafter, Euthasol® will be injected intravenously and after achieving the anesthetic action the pigs will be bled to complete the euthanasia process. The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker. Thereafter, appropriate tissue samples will be collected.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Not applicable

Naam van het project	Valideren en optimaliseren van organoïden ter vervanging van metingen aan levende varkens
NTS-identificatiecode	NTS-NL-410106 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	Varkens organoïden in vitro vervanging voor dierproeven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Gastro-intestinaal stelsel met inbegrip van de lever Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding

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).	De doelstelling van het onderzoek is om organoïden gemaakt van weefsel verzameld op verschillende belangrijke momenten in het leven van slachtvarkens te vergelijken met organoïden gemaakt van weefsel verzameld in het slachthuis, waarbij gen expressie gebruikt zal worden om de organoïden te vergelijken. Organoïden zijn cellen die in structuur en functie lijken op kleine mini-orgaantjes, en die ingezet kunnen worden om dieren te fenotyperen en om voer ingrediënten en medicijnen te testen. Hierdoor kan het aantal dierexperimenten vermindert worden.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, 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).	In dit project willen we het effect van de leeftijden het effect van geslacht van weefsel donoren onderzoeken op geproduceerde organoïden. In veel onderzoek is de leeftijd en het geslacht van dieren belangrijk. Mocht er bij het maken van organoïden geen effect van leeftijd zijn, dan kan er in toekomstig onderzoek slachthuismateriaal gebruikt worden, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. Daarnaast willen we onderzoeken of er een effect van het geslacht van weefsel donoren is op de geproduceerde organoïden. Mocht er geen effect van geslacht zijn, dan kan in toekomstig onderzoek gewerkt worden met 1 geslacht, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. De verwachte opbrengst van het project is een bijdrage aan de inzet van organoïden in onderzoek met landbouwhuisdieren.

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>In dit project zullen we weefsel verzamelen van varkens in het slachthuis en van varkens die op verschillende leeftijden gedood worden. Tijdens het project zullen de varkens in groepen gehuisvest worden waarbij ze op verschillende momenten gewogen worden en individuele voeropname bepaald wordt. De varkens worden gedood. Na het doden wordt er weefsel van o.a. de darmen, lever, en luchtwegen afgenomen.</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>Varkens zullen gehuisvest worden in commerciële onderzoeksfaciliteiten. Huisvesting zal geen ernstige gevolgen hebben voor dierenwelzijn. De geplande dierhandelingen geven een "licht" ongerief.</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 varkens worden gedood voordat weefsel verzameld wordt. Aan levenden dieren kan op dit moment geen weefsel verzameld worden van bepaalde delen van de darmen, de lever en de luchtwegen. Hierdoor dienen de dieren eerst gedood te worden.</p>				
	<p>Hergebruikt</p>	<p>Teruggeplaatst</p>	<p>Matig</p>	<p>Licht</p>	<p>Ernstig</p>
	<p>Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)</p>	<p>60</p>	<p>0</p>	<p>60</p>	<p>0</p>

TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p>1. Vervanging Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Doel is om te onderzoeken of organoïden gemaakt van weefsel verzameld van verschillende leeftijden mestvarkens en organoïden gemaakt van weefsel verzameld uit het slachthuis van elkaar verschillen of overeenkomstig zijn. Hierdoor moeten varkens op verschillende leeftijden gedood worden om weefsel te verzamelen. Dit kan niet worden vervangen door diervrije proeven of door proeven met andere diersoorten.</p>
<p>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.</p>	<p>In dit project worden verschillende projecten gecombineerd die gericht zijn op het gebruik en de toepassing van organoïden in onderzoek dat zich richt op landbouwhuisdieren. Weefsel monsters van verschillende organen (o.a. darmen, lever, en luchtwegen) worden verzameld van hetzelfde dier, om zo het aantal dieren te reduceren. Deze weefsel monsters zullen nauwkeurig opgeslagen worden, zodat ze voor toekomstig onderzoek ingezet kunnen worden. Varkens die in dit project gebruikt worden zijn niet betrokken geweest bij andere experimenten. Daarnaast worden alleen standaard metingen toegepast zoals het meten van lichaamsgewicht en individuele voeropname. Het aantal dieren is gebaseerd op basis van power berekeningen en op basis van kennis van voorgaande experimenten waarbij organoïden zijn gebruikt om verschillen aan te tonen tussen dieren. In dit project zullen alle weefsel monsters en organoïden opgeslagen worden in een bio-bank voor toekomstig onderzoek.</p>
<p>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.</p>	<p>Voordat weefsel verzameld wordt, worden de varkens gedood. Het doden van varkens zal uitgevoerd worden door een ervaren dierenarts of een gecertificeerd dierversorger om de stress die de varkens ervaren te minimaliseren. De dierversorgers zullen de dieren tijdens de handelingen rustig benaderen. De varkens worden verplaatst naar een aparte ruimte waar ze gedood worden en het weefsel verzameld wordt. Het weefsel wordt binnen een uur na doden verzameld. Er is geen verdere verfijning mogelijk.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>In dit project worden varkens gebruikt, omdat we al ervaring hebben met het maken van varkens organoïden. De varkens zullen gedood worden op een leeftijd van 1, 4 en 11 weken om weefsel en darmverteringsmonsters te verzamelen. Er is voor deze leeftijd gekozen omdat er rondom deze leeftijden veranderingen plaatsvinden in het functioneren van de darmen door veranderingen in voeding (week 4, spenen) en huisvesting (week 11 worden varkens vaak verhuisd naar een andere locatie). Verder zijn varkens vanaf ongeveer 11 weken immunologisch volwassen. Daarnaast zullen we weefsel in het slachthuis verzamelen.</p>

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 5 oktober 2021 12:05
Aan: 5.1 lid2h
CC: 5.1 lid2e 5.1 lid2h
Onderwerp: Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202115276

Geachte 5.1 lid2e

Op 03-08-2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115276. 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:

Onduidelijkheden

Uw aanvraag is behandeld in de afgelopen CCD vergadering. Hierbij is nog een onduidelijkheid over uw aanvraag. In de bijlage noemt u bij 'B. The animals - origin' dat de dieren uit hetzelfde nest zullen worden geïncubeerd. Kunt u onderbouwen waarom het noodzakelijk is dieren uit hetzelfde nest te gebruiken in het project?

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

5.1 lid2e

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



Centrale Commissie Dierproeven

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 the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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 Provide the title of the project.

Influence of age and sex in organoids of pigs

2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.

 Basic Research

 Translational or applied research

 Regulatory use of routine production

 Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare

 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 2.1.

Motivation

In the last decade, developments in cell biology have shown that it is possible to grow three-dimensional (3D) organ-like structures in culture and maintain them for virtually indefinite period of time. These structures, known as organoids, contain multiple cell types that resemble tissue, unlike current in vitro or ex vivo models. In addition, organoids recapitulate the key function(s) of the organ of origin. Organoids can be obtained from individual humans or animals, allowing for example patient-specific drug testing.

Currently, organoids are used extensively in biomedical research. Similarly, organoids can be used in veterinary and animal production research to explore disease mechanisms, e.g. by studying the interaction of organoids with pathogens, or to study complex traits such as resilience to diseases and feed efficiency (Kar et al., 2021). Organoids can be used as an in vitro (reductionist) tool to break-down these complex traits into well-defined molecular phenotypes. Organoids could thus provide an in vitro research platform for accurate and reproducible measurements of well-defined molecular variables in relation to the genotype of the animal, or in response to feed, management or veterinary treatments.

Organoids could increasingly replace animal testing. This project builds on organoid technology developed for mice and humans (Sato and Clevers, 2013) and also for pigs (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2018). However, to date, the system is often initiated with tissue materials collected at the slaughterhouse or sometimes from sacrificed animals in specific animal studies (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2020). Most of these studies have shown that it is possible to culture organoids. One study validated the model in terms of similarity to the corresponding cell line (Van der Hee et al., 2020). However, from the published scientific literature we were unable to obtain information on the effects of breed, sex and/or age on cultured intestinal organoids of pigs. There is strong evidence in the human literatures suggesting that adult stem cells appear to age with the person. As stem cells age, their functional ability also deteriorates (Brack et al., 2007; García-Prat et al., 2013; Oh et al., 2014; Schultz and Sinclair, 2016). However, we could not find any literature in livestock species, especially in pigs, demonstrating the influence of age on the stemness. Such knowledge is crucial for the use of organoids as an in vitro tool in livestock research.

In this proposal, we aim to characterize the differences- or similarities between the slaughterhouse material (Ellen et al., 2018; Van der Hee et al., 2020) and different age-related moments in the life of a slaughter pig using gene expression as measurement. Although a possible sex-specific effect has been suggested in the scientific literature on human and rodent nothing is yet known in pigs, so we will use both female and male animals. To date, information on the effects of age on cultured organoids of pigs is lacking. However, age-related moments are important for the feed industry, as different nutritional requirements must be met for each life stage. The results of this project will enable researchers and companies in the field of animal husbandry and health to use the in vitro model system as a tool for phenotyping and screening.

Background and context

The project of the current CCD application is part of a larger research program that aims to use organoids to 1) understand complex animal traits to improve selective breeding for these traits such as (feed) efficiency, health, resilience, host-microbe interactions, and welfare, and 2) as a screening tool for various feed/functional ingredients for nutritional research.

In this context, the potential use of organoid in vitro models to understand mechanisms and define new phenotypes will be explored. This project will focus on the use of organoids to study feed

efficiency and intestinal functionality in pigs. In addition, this research aims to reduce research models based on live animals by in vitro research models such as organoid culture technology.

To maximize the value of experimental animals, we did search for alternative pig studies within 5.1 lid2h in which animals are being sacrificed. Unfortunately, we were unable to find suitable pig studies of appropriate age in which we are interested. In addition, we will be collecting other organs of interest, such as liver, organs and tissues from respiratory tract, and skeletal muscle, which will be stored appropriately and can be used for further research upon request. Besides, digesta samples will also be taken from the gastro-intestinal tract of the sacrificed and slaughtered pigs to measure the digestibility of nutrients. This will help to better understand the difference between high and low feed efficient cohort of pigs. The knowledge and tools developed in this project can also benefit other industries, such as the (veterinary) pharmaceutical and food industries. In addition, pigs are often used as a model for human nutrition research (Miller and Ullrey, 1987). These pig intestinal organoids are used to measure nutrient uptake and epithelial response as well as to screen various feed/functional ingredients to reduce in vivo animal testing.

Ellen et al., 2018. Intestinal stem-cell organoids as experimental models to investigate feed efficiency. EAAP annual conference

Foulke-Abel et al., 2014. Human enteroids as an ex-vivo model of host-pathogen interactions in the gastrointestinal tract. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.) 239, 1124-1134.

Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. *Veterinary Research* 52: 43.

Miller and Ullrey, 1987. The pig as a model for human nutrition. *Annual Review of Nutrition* 7: 361-382

Sato and Clevers, 2013. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science* 340: 1190-1194

Van der Hee et al., 2018. Optimized procedures for generating an enhanced, near physiological 2D culture system from porcine intestinal organoids. *Stem Cell Research* 28: 165-171

Van der Hee et al., 2020. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Frontiers in Cell Development and Biology* 8:375

Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando. 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317: 807-810 doi:10.1126/science.1144090.

García-Prat, L., P. Sousa-Victor, and P. Muñoz-Cánoves. 2013. Functional dysregulation of stem cells during aging: a focus on skeletal muscle stem cells. *The FEBS Journal* 280: 4051-4062 doi:https://doi.org/10.1111/febs.12221.

Oh, J., Y. D. Lee, and A. J. Wagers. 2014. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* 20: 870-880 doi:10.1038/nm.3651.

Schultz, M. B., and D. A. Sinclair. 2016. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development* 143: 3-14 doi:10.1242/dev.130633.

3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

The general objective of this project is to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and various age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as a read-out.

Our objective is to investigate the effect of slaughterhouse material compared to age-related moments in the life of slaughter pigs, we will perform gene expression analysis on the cultured organoids. Tissues of interest will be obtained from either sacrificed piglets (1, 4 and 11 weeks old) or from slaughtered pigs (26 weeks old). Tissues of interest includes intestine, liver, organs and tissue from respiratory tract, and skeletal muscle.

3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

Using pigs, we already successfully cultured organoids from intestinal tissue of slaughterhouse pigs, we expect that our protocols can be imposed for the other age-related moments in the life of slaughter pigs. For the other non-intestinal organs necessary amendment may be required to the existing protocols from other species to culture the pig-derived organoids.

3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project? No Yes > Describe which laws and regulations apply and describe the effect on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

The biology of organoid is one of the most promising recent developments in the biological sciences. The number of scientific papers published annually on this topic has increased exponentially since 2010. Currently, applications of organoids are being explored and used in human biomedical research, e.g. to measure patient-specific drug efficacy, as a model to study host-microbe interactions, to study disease mechanisms, or for regenerative medicine. Compared to studies in human medicine, the number of organoid studies in livestock and veterinary research is rather limited, although organoid research is gaining momentum as a promising in vitro platform in livestock and veterinary research (Kar et al., 2021). Currently, there is growing interest from feed, pharmaceutical, and livestock breeding companies as well as -researchers, in the use of organoids in livestock as a potential research platform that can partially replace as well as reduce the use of animals in animal experiments. The study conducted will provide insight into the effects of collecting tissue samples at different life stages from pigs on cultured organoids. The results obtained in this project will be published in peer-reviewed journals.

Societal relevance:

Society in general, including the research communities and livestock industry, would like to reduce the number of experimental animals used. Using an organoid platform to measure well-defined "molecular" variables underlying animal performance could partially replace or reduce animal experiments in the animal nutrition, pharmaceutical, and livestock breeding industries and research. Unless we see a significant difference with respect to the objective of this project, only slaughterhouse material can be used for organoid-based research in pigs in the future.

Kar et al., 2021. Organoids: A promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. Veterinary research

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

The knowledge gained from the project will be of great interest for livestock breeding, (animal) nutrition and pharmaceutical companies. Breeding companies can use organoids as a phenotyping tool to study complex traits such as feed efficiency and select animals based on the molecular characteristics of the organoids. Nutrition companies can use organoids as a screening tool to test functional feed ingredients. Pharmaceutical companies can use organoids to test specific drugs. In addition, the use of organoids can enable the reduction of experimental animals.

3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

Strategy:

The general objective of this project is to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as a read-out (Appendix 1).

The project requires the involvement of animal procedures on live pigs. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We do not expect the ante- and post-mortem environment of the pigs on the cultured organoids. In addition, the organoids will be cultured under antibiotic conditions to prevent any bacterial infections. Pigs of both sexes will be used in equal numbers (n=30 males and 30 females) for sampling. At each time-point, i.e. 1, 4 and 11 weeks of age, we will sacrifice 10 male and 10 female pigs.

For the purpose of this project we will initially focus on pig intestinal tissues. Depending on the techniques developed to produce organoids from the intestine, we will also use tissues from other pig organs, such as liver, respiratory tract, and skeletal muscle, and develop protocols for culturing organoids from these tissues.

As an outlook to this project, we will maximize the use of samples collected from the sacrificed animals by reusing the cultured organoids for various relevant assays, such as 2D and transwell cell culture systems that are relevant for animal nutrition research.

Storage of biological material and data

A part of this project, the collected tissues and the organoids cultured from them will be cryopreserved and stored as a biorepository, available to the research community for future research upon justified request. Data collected in this project will be stored in accordance with the data management plan of 5.1 lid2h. Primary data will be stored in a biorepository, available for future research. Organoid read-outs and (adapted) gene expression data will be stored at the High-performance computer data storage facility of 5.1 lid2h that performs automated data back-up. Data handling for publications is recorded in lab journals that are kept for 5 years after publication of the manuscript.

3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

As we are interested in the effects of age on cultured organoids, we focus on three critical timepoints in the life of the slaughter pig, namely week(s) 1, 4, and 11. Week 1 represents the neonatal phase, week 4 the early post-weaning phase, and week 11 the growth phase. Furthermore, these life stages are known to bypass physiological changes in health and metabolism that support the growth performance.

As there is no clear evidence in pig scientific literature on the effects of sex on the organoid culture system, we chose to mix both sexes equally.

In our proposal, we intend to use transcriptomics as a read out to determine the age effect. We could not find any published literature that have estimated the number of pigs required to find significant differences between gene expression profiles of cultured organoids. We performed a two-sided power analyses, with a significance level of 0.05, and a power of 90%, and 10 pigs per sex per time-point, resulting in an effect size of 1.53. This means that differences greater than 1.53 in gene expression between comparisons are considered significant. We assume that 10 male and 10 female pigs at each timepoint is sufficient to examine the age effect.

3.4.3 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	Study effect of animal age on organoid models; Tissues collected after sacrificing pigs



Centrale Commissie Dierproeven

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 on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on 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 <i>Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.</i>	Serial number 1	Type of animal procedure Study effect of animal age on organoid models; Tissues collected after sacrificing pigs

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 this proposal, we aim to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material (Ellen et al., 2018; van der Hee et al., 2020) and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as read-out. Although a possible sex-specific effect has been suggested in the scientific literature on humans and rodents, nothing is yet known in pigs, so we will use both female and male animals. To date, information on the effects of age on cultured organoids from pigs is lacking. However, age-dependent moments are important to the feed industry because different nutritional requirements must be met for each life stage. The results of this project will allow researchers and companies in the field of animal husbandry and health to use the in vitro model system as a tool for phenotyping complex traits such as feed efficiency and screening of nutrients.

The project requires the involvement of animal procedures on live pigs. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. We do not expect the ante- and post-mortem environment of the pigs on the cultured

organoids. In addition, the organoids will be cultured under antibiotic conditions to prevent any bacterial infections. Pigs of both sexes will be used in equal numbers (n=30 males and 30 females) for sampling. At each time-point, i.e. 1, 4 and 11 weeks of age, we will sacrifice 10 male and 10 female pigs.

For the purpose of this project we will initially focus on pig intestinal tissues. Depending on the techniques developed to produce organoids from the intestine, we will also use tissues from other pig organs, such as liver, respiratory tract, and skeletal muscle, and develop protocols for culturing organoids from these tissues.

As an outlook to this project, we will maximize the use of samples collected from the sacrificed animals by reusing the cultured organoids for various relevant assays, such as 2D and transwell cell culture systems that are relevant for animal nutrition research.

References

Ellen et al., 2018. Intestinal stem-cell organoids as experimental models to investigate feed efficiency. EAAP annual conference

Van der Hee et al., 2020. Congruence of transcription programs in adult stem cell-derived jejunum organoids and original tissue during long-term culture. *Frontiers in Cell Development and Biology* 8:375

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

Pigs born in a commercial experimental facility are used to give a good representation of the commercial situation. Pigs will be housed in pens at the same facility to avoid transport-related stress. In accordance with commercial standards, individual body weights are determined at different ages using an electronic scale. Furthermore, pigs will be housed in pens where individual feed intake can be collected. Pigs are fed ad libitum. At 1 week, 4 weeks and 11 weeks of age, the pigs are slaughtered. This procedure is carried out by a specialized veterinarian according to "SOPS -00-28-1066 euthanasieren proefdieren". After sacrificing the pig, (tissue) samples are taken from the intestines, liver, organs and tissues of the respiratory tract, skeletal muscles and digesta samples will be collected.

Proposed animal procedures:

- Handling pigs to collect individual body weight
- Pen with individual feeding stations
- Sacrificing pigs

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

Researchers have used transcriptomics as a read out to measure the effect of their treatment derived from pig intestinal organoids using at least 7 animals (Khalil et al., 2016; Zhu et al., 2020). In our proposal, we intend to use transcriptomics as a read out to determine the age effect. We could not find any published literature that have estimated the number of pigs required to find significant differences between gene expression profiles of cultured organoids. We performed a two-sided power analysis, with a significance level of 0.05, and a power of 90%, and 10 pigs per sex per time-point, resulting in an effect size of 1.53. This means that differences greater than 1.53 in gene expression between comparisons are considered significant. We assume that 10 male and 10 female pigs at each timepoint is sufficient to examine the age effect.

References

Khalil et al., 2016. A novel culture system for adult porcine intestinal crypts. *Cell and tissue research* 365: 123-134

Zhu et al., 2020. L-Glutamate drives porcine intestinal epithelial renewal by increasing stem cell activity via upregulation of the EGFR-ERK-mTORC1 pathway. *Food Function* 11: 2714

B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
	42 - Pigs	Mild	1 week	20	Male and Female		
	42 - Pigs	Mild	4 week	20	Male and Female		
	42 - Pigs	Mild	11 week	20	Male and Female		

Provide justifications for these choices**Species**

The aim of this study is to develop methods for the production of organoids as an in vitro model from tissues of pigs. Therefore, pigs are used in this study.

Origin

The target animals for this experiment are conventional pigs (*Sus scrofa*) from a breed common in the Dutch sector. The piglets are from the same sire and dam line and are housed in a commercial experimental pig facility. The pigs used in this trial will originate from different litters (which are born in the same round), but there will be a genetic relationship between the piglets of the different ages.

Life stages

We are interested in the effects of age on cultured organoids and focus on three critical time points in the life of the slaughter pig, namely week(s) 1, 4 and 11. Week 1 represents the neonatal phase, week 4 the early post-weaning phase and week 11 the growth phase. These life stages are known to bridge physiological changes in health and metabolism that support growth performance. In addition, the age-dependent timing is important to the feed industry because different nutritional requirements must be met for each critical life stage.

Number

In total, 60 pigs will be sacrificed. Sacrificing pigs will take place at 1 week (n=20), 4 weeks (n=20) and 11 weeks (n=20) of age

Gender

Both sexes will be equally mixed, because it is unknown if there is an effect of gender on the produced organoids

Genetic alterations

Not applicable

Strain

Not applicable

C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

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.

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". Briefly, the pigs will be carried from their rearing pen to a separate dissection room after injecting sedating agents like Stresnil® or combination of Zoletil + Xylazine, inter muscularly to reduce any stress. Thereafter, Euthasol® will be injected intravenously and after achieving the anesthetic action the pigs will be bled to complete the euthanasia process. The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker. Thereafter, appropriate tissue samples will be collected.

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

Repeated body weight measuring and associated handling may induce stress.

Explain why these effects may emerge.

Stress related to animal handling can result from fear of people, fear of new situations, and fear of leaving group members.

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

Pigs are acclimated to or familiarized with animal handlers to minimize anxiety and stress when handling them. The pigs are approached in a calm manner.

E. 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 F.

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

Indicate the likely incidence.

F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Repeated handling of the pigs for body weight measures and using a needle for the injection to euthanize pigs is classified as mild discomfort.

G. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

We aim to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related moments in the life of a slaughter pig, using gene expression as read-out. Organoids will be cultured from tissue collected from piglets sacrificed at 1, 4 or 11 weeks of age and from pigs slaughtered at the slaughterhouse. As the objective required culturing of organoids from the tissues of the target animals to serve as a future in vitro model, an animal-free replacement is not possible.

Reduction

The number of animals was estimated based on power calculations using gene expression as read-out use to characterize the differences or similarities between the slaughterhouse material and different age-related time points in the life of a slaughter pig. In addition, pigs will be housed and sacrificed at the commercial experimental facility to avoid any transport stress. We will collect other organs of interest, such as liver, organs and tissues from respiratory tract, and skeletal muscle, which will be stored appropriately and can be used for further research upon reasonable request. Cryopreservation of tissue samples and organoids in the proposed biorepository will help reduce the use of animals in experiments for future research.

Refinement

Pigs will be sacrificed before collecting tissue samples. The procedure will be executed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker to reduce stress. Pigs will be moved to a separate room where they will be euthanized and tissue samples will be collected.

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

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

I. Repetition Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required. The production and use of organoids as in vitro models is extensively researched for biomedicines in humans and rodents, but also to limited extent in farm animals including pigs (Kar et.al. 2021). In the published scientific literature, we were unable to find information on the effects of breed, sex, and/or age on cultured intestinal organoids of pigs. The objective of this proposal is unique and therefore not repeated.

Reference

Kar et al., 2021. Organoids: a promising new in vitro platform in livestock and veterinary research. Veterinary Research 52: 43.

J. 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 K.

Yes > Describe this establishment.

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

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

In the selected pig facility piglets are born and raised, which prevents stress due to transport. Furthermore, pigs are housed in groups and handling will be done by experienced animal caretakers.

End of experiment

K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

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

Collection of relevant tissue samples for producing appropriate organoids particularly from (small) intestine, liver, and respiratory tract are not possible without sacrificing the pigs.

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 > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

Pigs are euthanized prior to tissue sampling according to the guidelines in the document "Euthanasie proefdieren_DEC_10021". Briefly, the pigs will be carried from their rearing pen to a separate dissection room after injecting sedating agents like Stresnil® or combination of Zoletil + Xylazine, inter muscularly to reduce any stress. Thereafter, Euthasol® will be injected intravenously and after achieving the anesthetic action the pigs will be bled to complete the euthanasia process. The procedure is performed by an experienced veterinarian or a certified animal caretaker. Thereafter, appropriate tissue samples will be collected.

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

Not applicable

Naam van het project	Valideren en optimaliseren van organoïden ter vervanging van metingen aan levende varkens
NTS-identificatiecode	NTS-NL-659416 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	Varkens organoïden in vitro vervanging voor dierproeven
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Gastro-intestinaal stelsel met inbegrip van de lever Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Diervoeding

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).	De doelstelling van het onderzoek is om organoïden gemaakt van weefsel verzameld op verschillende belangrijke momenten in het leven van slachtvarkens te vergelijken met organoïden gemaakt van weefsel verzameld in het slachthuis, waarbij gen expressie gebruikt zal worden om de organoïden te vergelijken. Organoïden zijn cellen die in structuur en functie lijken op kleine mini-orgaantjes, en die ingezet kunnen worden om dieren te fenotyperen en om voer ingrediënten en medicijnen te testen. Hierdoor kan het aantal dierexperimenten vermindert worden.
Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, 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).	In dit project willen we het effect van de leeftijden het effect van geslacht van weefsel donoren onderzoeken op geproduceerde organoïden. In veel onderzoek is de leeftijd en het geslacht van dieren belangrijk. Mocht er bij het maken van organoïden geen effect van leeftijd zijn, dan kan er in toekomstig onderzoek slachthuismateriaal gebruikt worden, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. Daarnaast willen we onderzoeken of er een effect van het geslacht van weefsel donoren is op de geproduceerde organoïden. Mocht er geen effect van geslacht zijn, dan kan in toekomstig onderzoek gewerkt worden met 1 geslacht, wat zal bijdragen aan het verminderen van dier experimenten. De verwachte opbrengst van het project is een bijdrage aan de inzet van organoïden in onderzoek met landbouwhuisdieren.

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>In dit project zullen we weefsel verzamelen van varkens in het slachthuis en van varkens die op verschillende leeftijden gedood worden. Tijdens het project zullen de varkens in groepen gehuisvest worden waarbij ze op verschillende momenten gewogen worden en individuele voeropname bepaald wordt. De varkens worden gedood. Na het doden wordt er weefsel van o.a. de darmen, lever, en luchtwegen afgenomen.</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>Varkens zullen gehuisvest worden in commerciële onderzoeksfaciliteiten. Huisvesting zal geen ernstige gevolgen hebben voor dierenwelzijn. De geplande dierhandelingen geven een "licht" ongerief.</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>Terminaal</p>	<p>Licht</p>	<p>Matig</p>	<p>Ernstig</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 varkens worden gedood voordat weefsel verzameld wordt. Aan levenden dieren kan op dit moment geen weefsel verzameld worden van bepaalde delen van de darmen, de lever en de luchtwegen. Hierdoor dienen de dieren eerst gedood te worden.</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.

Doel is om te onderzoeken of organoïden gemaakt van weefsel verzameld van verschillende leeftijden mestvarkens en organoïden gemaakt van weefsel verzameld uit het slachthuis van elkaar verschillen of overeenkomstig zijn. Hierdoor moeten varkens op verschillende leeftijden gedood worden om weefsel te verzamelen. Dit kan niet worden vervangen door diervrije proeven of door proeven met andere diersoorten.

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.

In dit project worden verschillende projecten gecombineerd die gericht zijn op het gebruik en de toepassing van organoïden in onderzoek dat zich richt op landbouwhuisdieren. Weefsel monsters van verschillende organen (o.a. darmen, lever, en luchtwegen) worden verzameld van hetzelfde dier, om zo het aantal dieren te reduceren. Deze weefsel monsters zullen nauwkeurig opgeslagen worden, zodat ze voor toekomstig onderzoek ingezet kunnen worden. Varkens die in dit project gebruikt worden zijn niet betrokken geweest bij andere experimenten. Daarnaast worden alleen standaard metingen toegepast zoals het meten van lichaamsgewicht en individuele voeropname. Het aantal dieren is gebaseerd op basis van power berekeningen en op basis van kennis van voorgaande experimenten waarbij organoïden zijn gebruikt om verschillen aan te tonen tussen dieren. In dit project zullen alle weefsel monsters en organoïden opgeslagen worden in een bio-bank voor toekomstig onderzoek.

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.

Voordat weefsel verzameld wordt, worden de varkens gedood. Het doden van varkens zal uitgevoerd worden door een ervaren dierenarts of een gecertificeerd dierversorger om de stress die de varkens ervaren te minimaliseren. De dierversorger zullen de dieren tijdens de handelingen rustig benaderen. De varkens worden verplaatst naar een aparte ruimte waar ze gedood worden en het weefsel verzameld wordt. Het weefsel wordt binnen een uur na doden verzameld. Er is geen verdere verfijning mogelijk.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

In dit project worden varkens gebruikt, omdat we al ervaring hebben met het maken van varkens organoïden. De varkens zullen gedood worden op een leeftijd van 1, 4 en 11 weken om weefsel en darmverteringsmonsters te verzamelen. Er is voor deze leeftijd gekozen omdat er rondom deze leeftijden veranderingen plaatsvinden in het functioneren van de darmen door veranderingen in voeding (week 4, spenen) en huisvesting (week 11 worden varkens vaak verhuisd naar een andere locatie). Verder zijn varkens vanaf ongeveer 11 weken immunologisch volwassen. Daarnaast zullen we weefsel in het slachthuis verzamelen.

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 15 oktober 2021

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115276

Instelling: 5.1 lid2h
Onderzoeker: 5.1 lid2e
Project: Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model
Aanvraagnummer: AVD202115276
Betreft: Nieuwe aanvraag
Categorieën: Fundamenteel onderzoek
Translationeel of toegepast onderzoek

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst omdat het een eenvoudige aanvraag betreft.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Vragen over de NTS</p> <p>In de NTS komt de term 'geëthanaseerd/euthanaseren' meerdere keren voor. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u deze term aanpassen in 'gedood/doden'?</p> <p>Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit aanpassen in uw NTS?</p> <p>In de NTS wordt vermeld dat individuele voerinname wordt bepaald. Dit blijkt niet uit de bijlage. Kunt u dit consistent maken?</p> <p>Vragen over Bijlage 3.4.3.1</p> <p>In het kader van het verminderen van het aantal proefdieren vraagt de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u, bijvoorbeeld, trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go/no-go moment wordt opgenomen?</p> <p>Bij de aan de DEC aangeboden stukken ontbreekt de titel van de bijlage</p>
---------------	--

<p>dierproeven. Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op commerciële veehouderij. Interpreteren wij het goed dat de richtlijnen voor huisvesting hiermee niet worden nagevolgd? Zo ja, kunt u dit noemen bij C van de bijlage dierproeven?</p> <p>U spreekt in de bijlage dierproeven bij punt K over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. De CCD wil echter weten welke methode u gebruikt. Kunt u dit punt aanvullen?</p> <p>Vragen over het aanvraagformulier</p> <p>De door u gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Wilt u dat we uw termijn aanpassen, met inachtneming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026? Zo niet, dan houdt de CCD de termijnen aan die genoemd zijn in het aanvraagformulier.</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Description animal procedures				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		60	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Description animal procedures

Citaat:

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Description animal procedures

Varkens (Sus scrofa domesticus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	<p>- Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht.</p> <p>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</p>
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) <input type="checkbox"/> Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g) <p>De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden betrokken van een commerciële onderzoeksfaciliteiten waar ze onder reguliere omstandigheden, in groepshuisvesting, gehouden worden.</p> <p>Citaat C15: De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Na vragen van de DEC hierover heeft de onderzoeker de aantallen dieren aangepast. De DEC is van mening dat er nu een realistisch aantal dieren gebruikt wordt. De DEC vraagt zich wel af of trapsgewijs uitvoeren (met go/no go's) van het project o.b.v. leeftijd van de dieren (starten met de jongste dieren omdat deze het meest afwijken van slachtleeftijd) een optie is om het aantal dieren in het onderzoek te verminderen.</p> <p>Citaat C21: De NTS is naar het oordeel van de DEC begrijpelijk geformuleerd, maar niet op alle punten aangepast n.a.v. de vragen die de DEC gesteld heeft en in om die reden niet meer op alle punten (o.a. beide geslachten) een goede afspiegeling van het aangepaste project.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat D: 1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het directe doel van het project, het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal verzameld op verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van mannelijke</p>
-------------------	--

en vrouwelijke slachtvarkens, het lichte ongerief en de aantasting van de integriteit van 60 proefdieren?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan de inzet van organoïden als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen te bestuderen.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren in dit project ervaren licht ongerief. De integriteit van de dieren wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert dit als een groot belang van grote morele waarde.
- Echter, hier tegenover staan toekomstige proefdieren. Wanneer organoïden ingezet kunnen worden dan zijn minder proefdieren nodig in de toekomst. De DEC waardeert dit ook als een groot belang van grote morele waarde.
- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een belang van geringe morele waarde ziet.
- De humane en dierlijke patiënten kunnen in de toekomst belang hebben bij de resultaten van dit onderzoek wanneer het model met organoïden ingezet kan worden voor testen en ontwikkelen van behandelmethoden. De DEC waardeert dit als een reëel belang van geringe morele waarde.
- De farmaceutische industrie heeft een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.
- Ook de (dier)voedingsindustrie heeft in de ogen van de DEC een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

De DEC heeft gediscussieerd of de laatste 3 belanghebbenden niet heel ver in de toekomst liggen. De onderzoeker noemt ze wel maar de DEC is van mening dat dat voor dit project nog niet aan de orde zal zijn en dat het doel van dit project zal zijn om een model te ontwikkelen en te kijken of dat model geschikt is. Om die reden geeft de DEC aan de laatste 3 belanghebbenden, in deze fase van ontwikkeling, een geringe morele waarde.

3.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal

verzameld van levende slachtvarkens t.b.v. het ontwikkelen van een model met organoïden met maximaal licht ongerief voor maximaal 60 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat D3:

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het dat u het minderheidsstandpunt in uw advies benoemt, ze had dit graag bij E2 apart benoemd zien worden.</p> <p>U geeft bij C21 van uw advies aan dat de NTS niet op alle punten een goede afspiegeling van het aangepaste project is. De CCD had graag een NTS gezien waarbij dit wel het geval was.</p> <p>Naar aanleiding van vragen van de DEC heeft de aanvrager het doel in haar huidige aanvraag aangepast. De CCD ziet dat er veel onderdelen uit het originele doel zijn verdwenen, waardoor het uiteindelijke doel helder en navolgbaar is. De CCD snapt dat de DEC vragen over het oorspronkelijke doel had. Echter, de CCD verzoekt de DEC om bij toekomstige aanvragen, bij het aanpassen van de doelstelling, de aanvrager een nieuwe aanvraag bij de CCD te laten indienen. Hierdoor wordt de onafhankelijkheid van de DEC gewaarborgd en kan er geen blijk van zijn dat de DEC meeschrijft aan een aanvraag.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

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

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Description animal procedures	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Description animal procedures	Er worden geen humane eindpunten verwacht.	
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	

Opmerkingen over de dierproeven

Naam proef	Opmerkingen
3.4.3.1 Description animal procedures	Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.

5 Samenvatting

5.2 lid1

[Redacted text]

Dit onderzoek richt zich op de ontwikkeling van organoids. Dit kan in de toekomst een vermindering in het gebruik van proefdieren opleveren.

Er is sprake van dieren die niet zijn gefokt voor dierproeven en de dieren worden gehouden op een locatie buiten de vergunninghouder. Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting. Zowe ^{5.2 lid1}

[Redacted text]

Het advies van de DEC is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of een go/no-go moment niet bijdraagt aan vermindering van de dieren. Het Secretariaat heeft aan de aanvrager gevraagd te onderbouwen of met toevoegen van dit go- no go moment de doelstelling van het project nog behaald kan worden.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

[Redacted text]

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 25 oktober 2021
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202115276

Instelling: 5.1 lid2h
 Onderzoeker: 5.1 lid2e
 Project: Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model
 Aanvraagnummer: AVD202115276
 Betreft: Nieuwe aanvraag
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek
 Translationeel of toegepast onderzoek

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst omdat het een eenvoudige aanvraag betreft.

Proces	<p>De volgende vragen zijn gesteld aan de aanvrager:</p> <p>Vragen over de NTS</p> <p>In de NTS komt de term 'geëthanaseerd/euthanaseren' meerdere keren voor. De CCD vindt dit verhullend taalgebruik. Kunt u deze term aanpassen in 'gedood/doden'?</p> <p>Bij 'Potential benefits...' noemt u enkel dat u leeftijd gaat vergelijken. Uit de rest van uw aanvraag blijkt dat u ook kijkt naar geslacht. Kunt u dit aanpassen in uw NTS?</p> <p>In de NTS wordt vermeld dat individuele voerinname wordt bepaald. Dit blijkt niet uit de bijlage. Kunt u dit consistent maken?</p> <p>Vragen over Bijlage 3.4.3.1</p> <p>In het kader van het verminderen van het aantal proefdieren vraagt de CCD zich af of in het project go/no-go momenten kunnen worden opgenomen waarbij u, bijvoorbeeld, trapsgewijs de verschillende leeftijdsgroepen includeert in uw onderzoek. Kunt u onderbouwen of de doelstelling van dit project behaald kan worden als dit go/no-go moment wordt opgenomen?</p> <p>Bij de aan de DEC aangeboden stukken ontbreekt de titel van de bijlage</p>
---------------	--

<p>dierproeven. Kunt u bij de bijlage dierproeven bij 1.3 een titel aan de bijlage geven? Kunt u de nieuwe titel ook bij 3.4.3 van het projectvoorstel aanpassen?</p> <p>U geeft in de bijlage dierproeven bij punt A aan dat er varkens worden gebruikt die verblijven op commerciële veehouderij. Interpreteren wij het goed dat de richtlijnen voor huisvesting hiermee niet worden nagevolgd? Zo ja, kunt u dit noemen bij C van de bijlage dierproeven?</p> <p>U spreekt in de bijlage dierproeven bij punt K over "Euthanasie proefdieren_DEC_10021" wat u gebruikt bij het doden van de dieren. De CCD wil echter weten welke methode u gebruikt. Kunt u dit punt aanvullen?</p> <p>Vragen over het aanvraagformulier</p> <p>De door u gewenste startdatum ligt in het verleden, en zelfs voor dagtekening. Wilt u dat we uw termijn aanpassen, met inachtneming van het maximum van 5 jaar, naar 04-10-2021 – 03-10-2026? Zo niet, dan houdt de CCD de termijnen aan die genoemd zijn in het aanvraagformulier.</p>				
Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
3.4.3.1 Description animal procedures				
	Varkens (Sus scrofa domesticus)		60	Dieren die niet voor onderzoek gefokt zijn

Locatie niet bij instelling

3.4.3.1 Description animal procedures

Citaat:

Pigs will be kept at a commercial experimental pig facility. Animal procedures will take place on the commercial experimental pig facility.

Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

3.4.3.1 Description animal procedures

Varkens (Sus scrofa domesticus)

Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

Locatie uitvoering experimenten	<p>- Niet alle proeven vinden plaats in een instelling van een vergunninghouder. Hierboven een overzicht.</p> <p>- Er zijn geen problemen bekend met de vergunninghouder.</p>
--	---

2 DEC advies

DEC-advies	<p>Citaat C9: Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) <input type="checkbox"/> Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g) <p>De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd.</p> <p>Citaat C10: De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden betrokken van een commerciële onderzoeksfaciliteiten waar ze onder reguliere omstandigheden, in groepshuisvesting, gehouden worden.</p> <p>Citaat C15: De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Na vragen van de DEC hierover heeft de onderzoeker de aantallen dieren aangepast. De DEC is van mening dat er nu een realistisch aantal dieren gebruikt wordt. De DEC vraagt zich wel af of trapsgewijs uitvoeren (met go/no go's) van het project o.b.v. leeftijd van de dieren (starten met de jongste dieren omdat deze het meest afwijken van slachtleeftijd) een optie is om het aantal dieren in het onderzoek te verminderen.</p> <p>Citaat C21: De NTS is naar het oordeel van de DEC begrijpelijk geformuleerd, maar niet op alle punten aangepast n.a.v. de vragen die de DEC gesteld heeft en in om die reden niet meer op alle punten (o.a. beide geslachten) een goede afspiegeling van het aangepaste project.</p> <p>Ethische afweging van de DEC: Citaat D: 1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het directe doel van het project, het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal verzameld op verschillende leeftijdsgerelateerde momenten in het leven van mannelijke</p>
-------------------	--

en vrouwelijke slachtvarkens, het lichte ongerief en de aantasting van de integriteit van 60 proefdieren?

2.

De DEC constateert dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft in haar afweging meegewogen dat, wanneer het project zijn uiteindelijke doel haalt dit een bijdrage kan leveren aan de inzet van organoïden als model om ziektemechanismen of complexe eigenschappen te bestuderen.

De DEC heeft haar afweging gemaakt na de volgende schade-baten analyse:

- De proefdieren in dit project ervaren licht ongerief. De integriteit van de dieren wordt niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef. De DEC waardeert dit als een groot belang van grote morele waarde.
- Echter, hier tegenover staan toekomstige proefdieren. Wanneer organoïden ingezet kunnen worden dan zijn minder proefdieren nodig in de toekomst. De DEC waardeert dit ook als een groot belang van grote morele waarde.
- De onderzoekers hebben een reëel wetenschappelijk belang dat de DEC waardeert als een belang van reële morele waarde.
- De CRO heeft, omdat dit contract-research onderzoek betreft, een economisch belang dat de DEC als een belang van geringe morele waarde ziet.
- De humane en dierlijke patiënten kunnen in de toekomst belang hebben bij de resultaten van dit onderzoek wanneer het model met organoïden ingezet kan worden voor testen en ontwikkelen van behandelmethoden. De DEC waardeert dit als een reëel belang van geringe morele waarde.
- De farmaceutische industrie heeft een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.
- Ook de (dier)voedingsindustrie heeft in de ogen van de DEC een beperkt economisch belang van geringe morele waarde.

De DEC heeft gediscussieerd of de laatste 3 belanghebbenden niet heel ver in de toekomst liggen. De onderzoeker noemt ze wel maar de DEC is van mening dat dat voor dit project nog niet aan de orde zal zijn en dat het doel van dit project zal zijn om een model te ontwikkelen en te kijken of dat model geschikt is. Om die reden geeft de DEC aan de laatste 3 belanghebbenden, in deze fase van ontwikkeling, een geringe morele waarde.

3.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar het karakteriseren van verschillen en overeenkomsten tussen slachthuismateriaal en materiaal

verzameld van levende slachtvarkens t.b.v. het ontwikkelen van een model met organoïden met maximaal licht ongerief voor maximaal 60 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat D3:

De centrale morele vraag kan voor de meerderheid van de DEC met "ja" beantwoord worden. De gehele DEC vindt de opmerkingen onder C.15 waardevol, maar 1 lid geeft aan dat het slechts tot een positief advies kan komen wanneer afdoende beargumenteerd wordt door de onderzoekers, dat trapsgewijze (in leeftijdsvolgorde) uitvoering van het project, met go/no go momenten tussentijds, niet mogelijk is of dat deze vermindering toegepast wordt.

3 Kwaliteit DEC advies

Kwaliteit DEC-advies
<p>Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.</p> <p>De CCD waardeert het dat u het minderheidsstandpunt in uw advies benoemt, ze had dit graag bij E2 apart benoemd zien worden.</p> <p>U geeft bij C21 van uw advies aan dat de NTS niet op alle punten een goede afspiegeling van het aangepaste project is. De CCD had graag een NTS gezien waarbij dit wel het geval was.</p> <p>Naar aanleiding van vragen van de DEC heeft de aanvrager het doel in haar huidige aanvraag aangepast. De CCD ziet dat er veel onderdelen uit het originele doel zijn verdwenen, waardoor het uiteindelijke doel helder en navolgbaar is. De CCD snapt dat de DEC vragen over het oorspronkelijke doel had. Echter, de CCD verzoekt de DEC om bij toekomstige aanvragen, bij het aanpassen van de doelstelling, de aanvrager een nieuwe aanvraag bij de CCD te laten indienen. Hierdoor wordt de onafhankelijkheid van de DEC gewaarborgd en kan er geen blijk van zijn dat de DEC meeschrijft aan een aanvraag.</p>

4 Inhoudelijke beoordeling

3V's

Er is in voldoende mate onderbouwd dat de doelstelling niet zonder dieren behaald kan worden en het project met zo min mogelijk dieren en zo verfijnd mogelijk wordt uitgevoerd.
--

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

Naam proef	Worden de dieren gedood?	Doden volgens richtlijn?
3.4.3.1 Description animal procedures	Ja	volgens de richtlijn.

Naam proef		
3.4.3.1 Description animal procedures	Er worden geen humane eindpunten verwacht.	
Varkens (Sus scrofa domesticus)	Ongerief: 100,0% Licht	

Opmerkingen over de dierproeven

Naam proef	Opmerkingen
3.4.3.1 Description animal procedures	Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.

5 Samenvatting

5.2 lid1

[Redacted text]

Dit onderzoek richt zich op de ontwikkeling van organoids. Dit kan in de toekomst een vermindering in het gebruik van proefdieren opleveren.

Er is sprake van dieren die niet zijn gefokt voor dierproeven en de dieren worden gehouden op een locatie buiten de vergunninghouder. Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting. 5.2 lid1

[Redacted text]

Het advies van de DEC is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. 1 lid van de DEC twijfelt of een go/no-go moment niet bijdraagt aan vermindering van de dieren. Het Secretariaat heeft aan de aanvrager gevraagd te onderbouwen of met toevoegen van dit go- no go moment de doelstelling van het project nog behaald kan worden.

6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

[Redacted text]

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

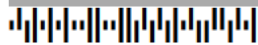


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h

**Centrale Commissie****Dierproeven**

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD 5.1 lid2h 202115276

Bijlagen

3

Datum 25 oktober 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

CONCEPT

Geachte 5.1 lid2e

Op 3 augustus 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115276. 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 26 oktober 2021 tot en met 3 oktober 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 20 september 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 23 september 2021 en 5 oktober 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, go/no-go momenten, de titel van de bijlage dierproeven, huisvesting volgens de richtlijn, de dodingsmethode en het includeren van dieren uit hetzelfde nest. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

25 oktober 2021

Aanvraagnummer:

AVD **5:1 lid2h** 202115276

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de gewenste startdatum een aantal maanden in het verleden ligt. Hierdoor is in overleg met de aanvrager is besloten de termijnen aan te passen.

Aanvullende opmerkingen

Hierbij wijzen wij u erop dat de locatie waar u de dierproeven wilt uitvoeren, VOORAF aangemeld moet zijn bij NVWA. Dit kan door een e-mail te sturen aan CHD@nvwa.nl met de gegevens van de vergunninghouder en gegevens van de nieuwe locatie.

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: 0800 789 0789.

Datum:

25 oktober 2021

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2n** 202115276

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

- Projectvergunning
- DEC-advies
- Weergave wet- en regelgeving



CONCEPT

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 26 oktober 2021 tot en met 3 oktober 2026, voor het project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD^{5.1 lid2h}202115276, na advies van ^{5.1 lid2h}

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 augustus 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 oktober 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Description animal procedures, zoals ontvangen op 14 oktober 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 14 oktober 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 20 september 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 4 oktober 2021, 14 oktober 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
3.4.3.1 Description animal procedures				Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.
	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	60	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.

Aanvraagnummer: AVD^{5.1 lid2h} 202115276

- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



Aanvraagnummer:

AVD^{5.1 lid2n} 202115276

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 lid2f 202115276

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

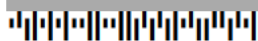


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h

5.1 lid2e

5.1 lid2h



Centrale Commissie

Dierproeven

Postbus 93118

2509 AC Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0800 789 0789

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD 5.1 lid2h 202115276

Bijlagen

3

Datum 26 oktober 2021

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e

Op 3 augustus 2021 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115276. 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 26 oktober 2021 tot en met 3 oktober 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 20 september 2021. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

Nadere vragen aanvrager

Op 23 september 2021 en 5 oktober 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, go/no-go momenten, de titel van de bijlage dierproeven, huisvesting volgens de richtlijn, de dodingsmethode en het includeren van dieren uit hetzelfde nest. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

Datum:

26 oktober 2021

Aanvraagnummer:

AVD **5.1 lid2h** 202115276

Overwegingen

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

De vergunde termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de gewenste startdatum een aantal maanden in het verleden ligt. Hierdoor is in overleg met de aanvrager is besloten de termijnen aan te passen.

Aanvullende opmerkingen

Hierbij wijzen wij u erop dat de locatie waar u de dierproeven wilt uitvoeren, VOORAF aangemeld moet zijn bij NVWA. Dit kan door een e-mail te sturen aan CHD@nvwa.nl met de gegevens van de vergunninghouder en gegevens van de nieuwe locatie.

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: 0800 789 0789.

Datum:

26 oktober 2021

Aanvraagnummer:AVD **5.1 lid2h** 202115276

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 26 oktober 2021 tot en met 3 oktober 2026, voor het project "Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115276, na advies van 5.1 lid2h . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 3 augustus 2021
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 14 oktober 2021;
 - b Bijlagen dierproeven
 - 3.4.3.1 Description animal procedures, zoals ontvangen op 14 oktober 2021;
 - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 14 oktober 2021;
 - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 20 september 2021
 - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 4 oktober 2021, 14 oktober 2021.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief	Overige opmerkingen
3.4.3.1 Description animal procedures				Er zullen varkens worden gebruikt die verblijven op een commerciële setting.
	Varkens (Sus scrofa domesticus)	60	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} 202115276

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 lid2f 202115276

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

Einde van een dierproef

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

Volgens artikel 13b 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.

Locatie

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

Van: info@zbo-ccd.nl
Verzonden: dinsdag 2 november 2021 11:15
Aan: 5.1 lid2h
Onderwerp: Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD 5.1 lid2h 202115276

Geachte 5.1 lid2h

Op 03-08-2021 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Validation and further improvement of organoids from pigs as an in vitro research model' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202115276.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op het aanpassen van de Niet Technische Samenvatting, go/no-go momenten, de titel van de bijlage dierproeven, huisvesting volgens de richtlijn, de dodingsmethode en het includeren van dieren uit hetzelfde nest.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 26-10-2021.

Het DEC advies is helder en navolgbaar. In het DEC advies is op heldere wijze inzicht gegeven in de vragen die aan de aanvrager zijn gesteld. Bij de beantwoording van de beoordelingsvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.

De CCD waardeert het dat u het minderheidsstandpunt in uw advies benoemt, ze had dit graag bij E2 apart benoemd zien worden.

U geeft bij C21 van uw advies aan dat de NTS niet op alle punten een goede afspiegeling van het aangepaste project is. De CCD had graag een NTS gezien waarbij dit wel het geval was.

Naar aanleiding van vragen van de DEC heeft de aanvrager het doel in haar huidige aanvraag aangepast. De CCD ziet dat er veel onderdelen uit het originele doel zijn verdwenen, waardoor het uiteindelijke doel helder en navolgbaar is. De CCD snapt dat de DEC vragen over het oorspronkelijke doel had. Echter, de CCD verzoekt de DEC om bij toekomstige aanvragen, bij het aanpassen van de doelstelling, de aanvrager een nieuwe aanvraag bij de CCD te laten indienen. Hierdoor wordt de onafhankelijkheid van de DEC gewaarborgd en kan er geen blijk van zijn dat de DEC meeschrijft aan een aanvraag.

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: 0800 789 0789

E: info@zbo-ccd.nl