

be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intra-cutaneous windows does not lead to post-operative discomfort. Depending on the duration of the experiment, the mice will be brought at least once and maximally eight times to the microscope. At the microscope mice will be anesthetized for at least an hour and maximum four hours for experiments with repetitive imaging. After an imaging session mice are allowed to recover, and brought back to the mouse house. In terminal experiments a maximum of 12 hours of intravital imaging will be performed. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

A detailed description of the window surgery, including postoperative assessment of behavior (largely normal scores) and weight (slight decreases 1 day post-surgery) is published by Ritsma *et al* in *Sci Transl Med* 2012 and *Nature Protocols* 2013.<sup>3,4</sup> These publications also describe subsequent intermittent intravital imaging. In short, mice will be anesthetized, positioned on a heat pad for proper temperature control and shaved. An incision is made in the skin for the intra-cutaneous window, while for the abdominal imaging window an incision is made in both skin and peritoneum. The incision is then sutured using a purse-string suture through both layers around the edges, creating four loops and leaving the suture untightened. Next, the window is placed within the incision. Different organs require different fixation techniques.<sup>4</sup> Ultimately, the skin (and peritoneum) are placed in the window groove, and the suture is tightened to fix the window.

For subsequent intravital imaging the mice will also be anesthetized and placed in a custom made imaging box. The microscope is covered by a climate chamber allowing proper temperature control. Saline will be administered subcutaneously (under anesthesia) for imaging sessions of more than an hour.

*Symptoms:* Mice can experience post-operative pain demonstrated by changed behavior as described in section J. Within 1 day post-surgery the majority of animals are found to behave normally. Intravital imaging sessions do not lead to noticeable symptoms.

*Level of discomfort:* moderate as a result of surgery, mild thereafter for intra-cutaneous windows, moderate thereafter for abdominal windows.

#### **IV (every experiment)**

##### **Killing of the animal and perform ex vivo analysis**

*Justification:* At the end of the experiment organs and cells will be harvested for ex vivo analysis.

*Description:* Depending on the type of experiment and the location of the experiment, mice will be killed by cervical dislocation while fully awake or while under anesthesia. Mice might also be killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation followed by cervical dislocation if the necessary facilities are available. In many experiments we would like to harvest blood before sacrificing the mouse. In this case mice will be deeply anesthetized using isoflurane after which a heart puncture will be performed followed by cervical dislocation. Relevant organs will be harvested, both for us and consortium colleagues. Tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays in vitro (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity). Our focus in the project is on immunotoxicology. We will look mostly at neutrophil, monocyte and macrophage numbers and activation status. We will look at blood, bone marrow, spleen, lymph nodes, kidney, liver and lungs. Brain, intestines and lungs if not needed by us will be shared with our other consortium members who have expertise with those organs.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician (figure 4 for example experiments).

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. This is possible for all FACS measurements and most imaging data. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a  $p < 0.05$ . Previous experiments using similar techniques required 5-10 animals to detect statistical significant differences.

However, many of our experiments are pilot studies, so we have limited idea how big the variation between mice will be. Through the pilot experiment we will obtain sufficient information (mean, SD) to perform a power

analysis for the main experiment. We will start with 3-5 mice in pilot experiments and then perform proper statistical analysis.

For instance in earlier experiments we found a mean of 263 (SD 106) neutrophils recruited to an imaging field upon the first day of injection of plastics or PBS control (maximum acute response) and this decreased to a mean of 34 (SD 13) neutrophils recruited at day 14 or later. If we want to investigate a toxic consortium plastic and we want to detect a difference of half maximum effect (ie 130 neutrophils recruited) we need a sample size of 7 (using an  $\alpha$  of 0.05/  $\beta$  of 0.2/ pooled SD of 60).

Qualitative analysis (descriptive analysis of some intravital imaging data): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

## 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
1	Mus musculus	Born in EU at registered breeder	No preference	4834	No preference	Yes, without harmful phenotype	Various

Provide justifications for these choices

Species	Our experience with mice and their immune system
Origin	We can use surplus mice from the breeding facility, and try to source our genetically altered mice more local to reduce impact on mice and the environment.
Life stages	We don't expect an age effect, so all mice can be used
Number	<p><u>Estimated numbers</u></p> <p><b>Pilot studies</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Determine minimum number of oral administration + compare oral gavage with food uptake (5 mice, min 1 and max 10 administrations, 2 routes = <b>100 mice moderate due to gavage</b>)</li> <li>➤ Determine minimum number of intranasal administration (5 mice, min 1 and max 10 administrations = <b>50 mice mild</b>)</li> </ul> <p>We have 1 reference polystyrene + 3 consortium plastics polymer types, of at most 3 different sizes. Not all sizes will be used for all administration routes. We can have up to 2 different coatings of the plastics in addition to the non-coated control: biofilm and relevant bodily fluid like mucus or serum. For each experiment we need at most two control groups. We are interested in long-term effects of the plastics to mimic human exposure, so multiple time point per administration route are needed, except when we can do intravital imaging. For our previous IV injection experiments we saw changing kinetics using 4h, 16h, 14 days and 30 days. In the future we would like to add a longer term time point as well.</p> <p>Our studies are mainly descriptive and exploratory to determine the effects of microplastics. We do not yet know what their effects will be. We think 5 animals will be enough, but actually we can only determine the sample size after we performed the experiment on 3 mice and determine the variability between animals. To calculate the maximum number of mice needed for this proposal we overestimate the use by calculating with 7 animals per group.</p> <p>Oral exposures (ex vivo analysis):            4 plastics x 3 sizes per plastic type x 3 coatings + 2 controls x 7 animals x 5 time points)= <b>1330 mice mild or moderate depending on nr of administrations and administration route from pilot</b></p> <p>Intranasal exposures (ex vivo analysis):            4 plastics x 3 sizes x 3 coatings + 2 controls x 7 animals x 5 time points)= <b>1330 mice mild or moderate depending on nr of administrations from pilot</b></p>

IV injection (ex vivo analysis):

4 plastics x 2 sizes (size restriction due to clotting) x 3 coatings + 2 controls x 7 animals average x 5 time points = **910 mice (120 mild without coating and 790 moderate)**

Intradermal (repetitive intravital imaging):

4 plastics x 3 sizes x 3 coatings + 2 controls x 7 animals = **266 mice moderate**

Subcutaneous (repetitive intravital imaging):

4 plastics x 1 size x 3 coatings + 2 controls x 7 animals = **98 mice moderate**

#### Exploratory studies

These are exploratory studies that will evolve during the project, numbers are estimates. Typical work protocols are between 10 and 50 mice and typically 5 experiments are performed per year. (30 mice \* 5 exp \* 5 years = 750)

**Max 750 mice (400 mild, 350 moderate)**

However, these numbers are overestimations because:

- It is unlikely that all plastics types and/or all sizes will need to be tested *in vivo*. This will be determined before the animal experiments will be performed (*in vitro* or pilot experiments).
- For now we estimate to test two different coatings, but we may only need to test one. This will be determined *in vitro* before the animal experiments will be performed.
- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group in consecutive studies.
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Additionally, a number of ca. **150 mice** is needed for:

	Estimated nr
Pilot studies for validation of models/techniques#	50
Training of new personnel or new techniques <sup>x</sup>	50
To compensate for unforeseen loss of animals*	50

#Only procedures mentioned in this project proposal

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

<sup>x</sup>Intravital imaging is a procedure that requires proper training of surgical skills in order to prevent discomfort to the animal as much as possible

\*(max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

Together we therefore anticipate we need a grand total of **4834 mice (worst case 620 mild and 4214 moderate)**.

Gender	We don't expect a gender effect, so both female and male can be used
Genetic alterations	For some experiments we require intravital imaging strains or knock-out strains
Strain	Phagocytosis is such an evolutionary conserved mechanism that we expect differences between strains to be minimal. The genetically modified mice bearing green neutrophils are in the C57BL/6 background as are genetically modified mice bearing YFP dendritic cells, therefore we want to perform most if not all experiments in that strain. On top of that, by using this background we can also use surplus mice from standard breeding at the GDL facility, mice that would otherwise be discarded. Other genetically modified mice expressing a reporter for a fluorescent protein in different immune cells might be used if not available on the C57BL/6 background.

### 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

[Click or tap here to enter text.](#)

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

No pain (but mild discomfort) is expected to occur for:

- uptake via food or drinks
- oral gavage
- intravenous administration by tail vein
- intraperitoneal administration
- CO<sub>2</sub> asphyxiation
- cervical dislocation

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

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

Some pain is expected to occur for:

- acute inflammatory response after LPS administration
- acute inflammatory response after bacterial administration

These acute inflammatory response will evoke fever, shivers and muscle ache. Analgesia will influence the immune response that we are studying. We also perform these type of studies in human volunteers without anesthesia or analgesia.

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

The procedures requiring anesthesia and/or analgesia are listed below and detailed in section 2.

- retro-orbital intravenous injection under isoflurane anesthesia, no analgesia
- intranasal application under isoflurane anesthesia, no analgesia
- intradermal application under isoflurane anesthesia, no analgesia
- subcutaneous application under isoflurane anesthesia, no analgesia
- Sterile injury under isoflurane anesthesia, no analgesia
- Non-survival intravital imaging under isoflurane anesthesia, no analgesia
- Repetitive skin imaging under isoflurane anesthesia, no analgesia
- Repetitive imaging after placing dermal imaging window under isoflurane anesthesia, analgesia pre- and post-surgery<sup>5</sup>
- Repetitive imaging after placing abdominal imaging window under isoflurane anesthesia, analgesia pre- and post-surgery<sup>3,4</sup>
- Terminal heart puncture followed by cervical dislocation under isoflurane anesthesia, no analgesia

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

**Inflammatory stimulus: Plastic particles/ Non-plastic inert materials**

*Symptoms:* Intradermal injections of microplastics, I.V. microplastics injection and oral microplastic administration are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Intranasal administration of microplastics has not been described before, but are expected to be in line with the mild effects of the other administration routes. However, weight loss and behavioral changes as described in section J will be tightly monitored for the animals in this route. Subcutaneous administration will require a small surgical procedure with likely moderate discomfort as a result.

*Level of discomfort:* mild (oral via food, intranasal, I.V., intradermal) or moderate (oral gavage, intranasal when administered more than 2 times, subcutaneous)

Inflammatory stimulus: Plastic particles with biofilm

*Symptoms:* Pathogens on the surface of the plastics will likely evoke symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.  
*Level of discomfort:* moderate.

Inflammatory stimulus: Bacterial infection

*Symptoms:* Intradermal injections of dead bacteria are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Intravenous injection of dead and live bacteria, intradermal injection of live bacteria and intranasal application of live and dead bacteria can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.  
*Level of discomfort:* moderate

Control inflammatory stimulus: Sterile injury

*Symptoms:* These local inflammations are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms.  
*Level of discomfort:* mild

Control inflammatory stimulus: LPS injection

*Symptoms:* Mice are expected to have transient (< 1 day) symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.  
*Level of discomfort:* moderate

Administer compounds

*Symptoms:* Most compounds will not lead to noticeable symptoms.  
*Level of discomfort:* mild or moderate

Intravital imaging

*Symptoms:* Mice can experience post-operative pain demonstrated by changed behavior as described in section J. Within 1 day post-surgery the majority of animals are found to behave normally. Intravital imaging sessions do not lead to noticeable symptoms.  
*Level of discomfort:* moderate as a result of surgery, mild thereafter for intra-cutaneous windows, moderate thereafter for abdominal windows.

Explain why these effects may emerge.

See above

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

Only skilled personnel will perform the procedures. Due to our experience with injecting bacteria or LPS, we know the safe (concentration) range and the risk is minimal. Mice with windows will be monitored at least twice a week for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized. If the experimental set-up allows (e.g. end point is  $\leq 3$  hours after I.V. LPS injection) the whole procedure will be done under anesthesia.

**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.

The experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Reaching a score of 4 on the illness scale (specified below) or severe shortness of breath is set as an humane end point.

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

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

- 3: ruffled fur and inactive
- 4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt
- 5: dead

Additional model specific parameters:

Plastic particles with biofilm/ Bacterial infection/ LPS injection

Weight fluctuations within 5% up or down from starting weight will be considered normal.

- animals will be weighed every day for the first 4 days after procedure/injection because at this timeframe the innate immune response is expected to show most effects and the adaptive immune response has not yet started: if 20% or more weight loss occurs in these days the animal will be euthanized that same day

- after day 4 the mice will be weighed every 3 days: if 15% or more weight loss occurs over those 3 days, the animal will be again monitored daily

- if a weight loss of 20% or more has occurred at any point of the experiment, the animal will be euthanized that same day

Intravital imaging

Loss of the intravital imaging window is set as a humane endpoint.

Infection of the skin around the intravital imaging window is additionally set as a humane endpoint (has never happened so far).

Indicate the likely incidence.

Expected to be <5% and <1 day

**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).

Level of discomfort is indicated in section A for each injection and technique at the bottom of each paragraph. Also the category assignment is described extensively in the adverse effects section above.

We have summarized the discomfort of all experiments except for the explorative studies in the following Table:

Route	Summary	Timing	Cumulative discomfort
Pilot	Administer plastics min 1 and max 10 days, euthanize for ex vivo analysis	1-10 days	Mild for 100 Moderate for 50 (10 days of gavage)
Oral exposure	Administer plastics min 1 and max 10 days, euthanize for ex vivo analysis at 4h, 16h, 14 days, 30 days and 100 days	1-100 days	Max 1330 mice Mild (intranasal or food) Or moderate (gavage) depending on pilot
Intranasal exposure	Administer plastics min 1 and max 10 days, euthanize for ex vivo analysis at 4h, 16h, 14 days, 30 days and 100 days	1-100 days	Max 1330 mice Mild (up to 3x intranasal) Or moderate (10x intranasal) depending on pilot
IV injection	Administer plastics iv at day 0, euthanize for ex vivo analysis at 4h, 16h, 14 days, 30 days and 100 days	1-100 days	120 mild without coating and 790 potentially with coating moderate
Intradermal	Administer plastics intradermally at day 0, image intradermally max 6 times	1-100 days	266 mice moderate
Subcutaneous	Administer plastics intradermally at day 0, place imaging window, image intradermally max 6 times	1-100 days	98 mice moderate

In addition max 750 mice (400 mild, 350 moderate) will be used for exploratory studies.

For these studies plastics will also be administered for 1-10 days, the timing will be 1-100 days as well, but additionally compounds will be administered to for example visualize cells, measure cell death or lifespan. Most

compounds will not lead to noticeable symptoms and if they do it will become a terminal experiment. Hence a big proportion of these experiments are expected to be mild.

However also experiments that would cause most discomfort fall in this exploratory category. An example of an experiment that could be considered to have the highest discomfort of this proposal is to iv inject microplastics at day 0, place an imaging window on the liver (under anesthesia with proper analgesia pre and post-surgery) and image at max 5 time points under anesthesia between day 1 and max day 28<sup>3,4</sup> in order to visualize the microplastic accumulation which we have found in our previous work.

Where possible we will be using anesthesia to reduce the discomfort of the mice. Unfortunately the usage of analgesics can have an effect on the immune cells, especially the neutrophils, and will therefore be prevented as much as possible. Overall, pain and discomfort should be short-lived, and we always aim to keep it as short and minimal as possible. Calculating for the worst case scenario, the cumulative discomfort is mild for **12.83% (620)** of the total number of animals (oral administration via food, IV injection, intradermal injection), and moderate for **87.17% (4214)** of the total number of animals (intranasal administration, oral gavage, subcutaneous injection, window placement, inflammation models, intravital imaging).

### 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	Initial testing for plastics of interest concerning their polymer composition, their size and their coating will be done in in vitro settings. Many experiments of the project will be performed using human primary cells, human and mouse cell lines, organoids and organs-on-a-chip by us and others. This will ultimately determine the number of animal experiments to be performed.
Reduction	By using techniques like intravital imaging, we reduce the number of mice used in longitudinal studies because the same mouse can be imaged over the entire span of the experiment. After completion of the intravital imaging experiments, cells, tissues and organs will be isolated and analyzed to reduce the number of mice required. Using genetically modified mice will give us more insight per mouse as to the effect of microplastics on neutrophils, and to an extend macrophages. With more information retrieved per mouse, less animals are necessary. By sharing organs, other institution no longer need to perform the experiments as well to obtain their tissues.
Refinement	Anesthesia will be used for most procedures and husbandry will kept at an optimum to reduce discomfort and stress. For most experiments we first consider ex vivo experiments (mild discomfort) or terminal experiments, before we consider repetitive intravital imaging experiments (moderate discomfort). In some experiments we first consider repetitive intravital imaging, either because some questions can only be answered by imaging the same tissue over multiple imaging sessions or because it reduces the number of mice (see above). In pilot experiments we will determine the least amount of oral and intranasal administrations needed to detect microplastics in the tissue, and we will establish if we can switch from oral gavage to administration via food. Our aim is to administer via food, but if oral gavage is necessary, the procedure will be refined by training to use tube gavage. Analgesia will be applied during the window placement. Mice will be placed on thermal plates during surgery. Windows are made of biocompatible titanium material and have a groove that fits and hides the suture. Saline will be administered i.p. during long intravital imaging sessions. Eye ointment will also be used to prevent dry eyes. We have over a decade of experience with this technique.

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.

Click or tap here to enter text.

### 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.

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

No

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

Click or tap here to enter text.

### 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.

Click or tap here to enter text.

### 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.

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

Click or tap here to enter text.

## 3. 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.

Click or tap here to enter text.

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

Full analysis of the organs exposed to plastics requires us to euthanize the mice

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

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

Click or tap here to enter text.

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

No > Describe the method of killing.

Most mice will be euthanized using cervical dislocation performed under anesthesia. Occasionally CO<sub>2</sub> asphyxiation followed by cervical dislocation or cervical dislocation without anesthesia will be performed.

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

Click or tap here to enter text.

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

Not applicable

### References for the whole appendix



1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of *Staphylococcus aureus* skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).

2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat Commun* **5**, 5438 (2014).

## 5.1 lid2e, 5.1 lid2h

5. Mourao L, *et al* (2022) Longitudinal intravital imaging using a mammary imaging window with replaceable lid.

## 5.1 lid2e, 5.1 lid2h

Naam van het project	Wisselwerking tussen microplastics en ons aangeboren immuunsysteem
NTS-identificatiecode	NTS-NL-004854 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	Microplastic Immuunsysteem Afweercellen
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Immunstelsel Omzettinggericht en toegepast onderzoek: Niet op grond van regelgeving vereist toxicologisch en ecotoxicologisch onderzoek Bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier

## 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>Dagelijks krijgen we microplastics binnen. De microplastics komen onder andere van flesjes water, voedselverpakking, en nylon kleding. Die komen via de lucht, ons eten en drinken ons lichaam binnen. Maar we weten nog niet wat er met ons gebeurt als plastic ons lichaam binnen komt, of hoe schadelijk het nu eigenlijk is. Daarnaast zwerft plastic in onze omgeving rond. Daar komt het in aanraking met bacteriën en virussen die ons ziek kunnen maken. Het zou zo kunnen zijn dat bacteriën via plastic ons lichaam binnen komen, maar dat weten we nog niet zeker. We hebben geld gekregen van de Nederlandse overheid om dit uit te zoeken, zodat zij de regels over plastic kunnen aanpassen.</p> <p>In ons lichaam zijn onze afweercellen altijd bezig om binnendringers op te ruimen. Normaal zijn dat bacteriën, parasieten en virussen. Deze drie indringers kunnen worden afgebroken en opgeruimd door de afweercellen. Plastic dat ons lichaam binnen komt kan niet worden afgebroken door afweercellen. Hierdoor gaan de afweercellen dood. Dit kan ontstekingen en andere slechte gevolgen hebben op korte termijn. We weten ook nog niet wat het gevolg is van dit soort irritatie van het afweersysteem als het de rest van ons leven aanhoudt.</p> <p>Met deze dierproeven willen wij uitzoeken hoe een plastic via de longen of de darmen ons lichaam binnen komt, en hoe schadelijk de meest voorkomende plastics zijn voor ons afweersysteem. We willen weten in welke organen de plastics terecht komen, en welke afweercellen erop reageren. We willen ook uitzoeken hoe lang een plastic op een bepaalde plek in ons lichaam blijft. Zo willen we bepalen hoe schadelijk de plastics kunnen zijn, of dat het misschien wel mee valt.</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	<p>Door uit te zoeken wat plastic in ons lichaam met ons afweersysteem doet, kunnen we bepalen hoe schadelijk het is. Nu komen we elke dag met veel plastic in aanraking, omdat er geen regels over zijn. Dus we weten niet hoeveel schade we per dag oplopen door de plastics die we binnen krijgen. Op dit moment kunnen bedrijven zelf kiezen om minder plastic te gebruiken in hun verpakkingen, maar er zijn geen regels dat ze dat moeten doen. Als wij laten zien in hoeverre plastic schadelijk is voor onze gezondheid, kan de overheid regels maken die het plasticgebruik verminderen. Zo beschermen we niet alleen onze gezondheid, maar verminderen we ook de hoeveelheid plastic die in de natuur belandt vanuit ons afval.</p>

lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).

**VOORSPELDE SCHADE**

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>De muizen worden op natuurlijke of kunstmatige manier blootgesteld aan de plastics. We willen plastic via het eten en via de lucht toedienen om uit te zoeken hoeveel ze in hun bloed krijgen. We willen de plastic ook direct in het bloed spuiten om te zien waar in het lichaam plastic terecht komt. Daarnaast willen we plastic in de huid spuiten om met de microscoop te zien hoe afweercellen erop reageren. We gaan ook experimenten doen waarbij we een kijkvenster plaatsen op een orgaan zodat we over de tijd kunnen kijken of en hoe lang de plastics blijven zitten. Deze experimenten vergen een operatie en daar zullen we pijnstilling voor gebruiken.</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>Voor de meeste behandelingen worden de muizen in slaap gebracht zodat ze niks merken. We hebben eerder gezien dat de muizen geen zichtbare last hebben van de plastic als we tot een paar maanden kijken. De negatieve gevolgen zullen daarom klein zijn voor de muizen. Er zijn sommige procedures waarbij de muizen wel stress ervaren maar die bij mensen ook niet onder anesthesie worden uitgevoerd zoals bloedafname, orale toediening en het oproepen van een ontstekingsreactie. We gaan ook experimenten doen waarbij we een kijkvenster plaatsen op een orgaan zodat we over de tijd kunnen kijken of en hoe lang de plastics blijven zitten. Deze experimenten vergen een operatie en daar zullen we pijnstilling voor gebruiken.</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>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>4834</td> <td>0</td> <td>620</td> <td>4214</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	4834	0	620	4214	0
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	4834	0	620	4214	0												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>We moeten weten wat er in het bloed en de organen gebeurt met de afweercellen door de plastic. Omdat we meerdere organen willen bekijken aan het einde van ieder experiment, is het niet mogelijk om de muizen te laten leven aan het einde.</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.

In ons consortium gebruiken we voornamelijk niet-dierlijke alternatieven. Verschillende consortiumpartners hebben verschillende orgaanexpertises. De plastics worden op gedoneerde menselijke cellen in het lab getest om te bepalen welke plastics mogelijk gevaarlijk zijn als we ze binnen krijgen. Hiervoor gebruiken we de cellen direct uit het lichaam, maar ook kweken we de cellen op tot meer geavanceerde mini-darmpjes en mini-longetjes. Met deze proeven in kweekschaltjes kunnen we een inschatting maken van de toxiciteit. Wij zijn de enigen die ook dierexperimenten uitvoeren. Met deze dierproeven leveren we een cruciale link door de bewegingen van microplastics door het hele lichaam te volgen en door te bepalen hoe lang ze op een bepaalde plek blijven zitten. Ook zullen we een bepaalde hoeveelheid plastics aan een muis te eten geven en vervolgens bepalen hoeveel daarvan het lichaam binnendringt. Dit type proeven kunnen momenteel nog niet in kweekschaltjes worden uitgevoerd.

### 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.

Door meerdere onderzoeken in dezelfde muis te doen, hebben we minder muizen nodig. Ook door in dezelfde muis op meerdere momenten live te kijken wat er met de plastics gebeurt, hebben we minder muizen nodig.

### 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.

Voor de meeste handelingen die we met de muizen doen die pijn kunnen doen of stress geven, brengen we ze in slaap. Wanneer we een operatie uitvoeren waarna de muis wakker wordt geven we pijnstilling. Voor de orale toediening willen we vroeg in het project verschillende toedieningsmethodes vergelijken. We willen nagaan of de plastics ook de darmwand passeren als we ze in het voedsel geven of in een druppel gecondenseerde melk in plaats van via directe toediening in de slokdarm zoals we eerder gedaan hebben.

Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe

We hebben veel ervaring met muizen en hun afweersysteem. We weten hoe het op ons afweersysteem lijkt. Ook zijn de methoden om afweercellen te herkennen en te markeren in de muis het meest ontwikkeld. Daarom hebben we voor muizen gekozen. We gaan in muizen van verschillende leeftijden kijken omdat bij mensen ook jong en oud met plastic te maken heeft en omdat we eerder verschillende resultaten hebben gevonden bij muizen van verschillende leeftijden.

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	nee
Termijn voor BA	
<b>Reden voor de beoordeling achteraf</b>	
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 26 april 2023

Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216420

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system  
 Aanvraagnummer: AVD202216420  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Bescherming van het milieu

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.


<p><b>Proces</b></p> <p></p>	<p>De aanvraag was in een eerder stadium door de DEC beoordeeld als niet-toetsbaar. Na aanpassingen van de door de DEC aangehaalde punten is de aanvraag opnieuw aangeboden aan de DEC en heeft zij hier advies over uitgebracht.</p> <p>Er zijn vragen gesteld aan de aanvrager.</p> <p>Vraag over de NTS:        De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?</p> <p>Vraag over het  <b>aanvraagformulier</b>        De door u gewenste startdatum ligt inmiddels in het verleden. Mocht u de gewenste start- en einddatum willen herzien, kunt u dit doen door een nieuw, ondertekend aanvraagformulier met aangepaste start- en einddatum in te dienen.</p>			
<p><b>Naam proef</b></p>	<p><b>Diersoort</b></p>	<p><b>Stam</b></p>	<p><b>Aantal dieren</b></p>	<p><b>Herkomst</b></p>
<p><b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b></p>				
	<p>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</p>	<p>GGO</p>	<p>4.834</p>	<p>Dieren die voor onderzoek gefokt zijn</p>

# Overzicht van opmerkingen bij AdviesNotaCCD\_1\_5.1 lid2e.pdf


---

Pagina: 1

---

 Nummer: 1    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Notitie Datum: 28-4-2023 13:58:19

Bij de Heps staat dat een hep is bereikt bij een 'ernstig tekort aan lucht'. Dit mag wat specifiekker. Hoe lang moet dit aanhouden, wat is een ernstig te kort (is dat ook zwaarder ademen)?

 Nummer: 2    Auteur: 5.1 lid2e    Onderwerp: Markering    Datum: 28-4-2023 13:58:28

Aanvraagformulier:



## Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

### 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls

Citaat:

Some pain is expected to occur for:

- acute inflammatory response after LPS administration
- acute inflammatory response after bacterial administration

These acute inflammatory response will evoke fever, shivers and muscle ache. Anelgesia will influence the immune response that we are studying. We also perform these type of studies in human volunteers without anesthesia or anelgesia.

## Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

### 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls

Muizen (*Mus musculus*) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

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

## 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat B4: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.</p> <p>Citaat C1: De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De beschreven aanvraag is in de huidige vorm begrijpelijk opgesteld, navolgbaar in de onderzoeksvragen en hoe deze zijn vertaald in de diverse experimenten en daardoor toetsbaar geworden. De onderzoekers maken deel uit van een groter Nederlands consortium, dat gefinancierd wordt door de overheid. Het gehele onderzoek is verdeeld in verschillende delen per deelnemer van het consortium. De aanvragers zullen hun aandeel onderzoeken: <b>Wat de risico's zijn van blootstelling van microplastics bij de mens.</b> Er zal door de aanvragers worden onderzocht wat de effecten in-vivo zijn, nadat andere partners de karakterisatie en de in-vitro blootstellingen hebben onderzocht. Het eerder beschreven fundamentele onderzoek naar specifieke rol van neutrofielen is er uit gehaald. Maar de onderzoekers zullen hun kennis van neutrofielen benutten om de in-vivo experimenten uit te voeren. [...]</p> <p>Ethische afweging van de DEC:</p>
-------------------	---

---

Nummer: 1      Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Markering      Datum: 28-4-2023 14:28:27

Als ik deze zin lees 5.2 lid1

Maar translationeel onderzoek is geen van de aangegeven doelcategorieën.

---

↻ Auteur: 5.1 lid2e      Onderwerp: Notitie Datum: 28-4-2023 15:00:37

Staat genoemd in de bijlage:

### **The model**

For these experiments we will use mice, since many fluorescent reporters exist, intravital imaging is optimized for this species, many required reagents to detect immune cells are readily available for this species. Wild type or intravital imaging (fluorescent reporter) strains or knockout strains will be used. The fact that mice are relatively cheap, easy to house and have shorter administration to response time due to the high metabolic rate, are additional reasons to use mice.

Citaat D:

1.

De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk of het bepalen van het gezondheidsrisico aan blootstelling van microplastics met het uiteindelijke doel om overheden, publiek en fabrikanten te informeren over potentieel schadelijke microplastics en indien noodzakelijk regelgeving aan te passen en meer kennis te verzamelen over de effecten van microplastics, die epitheliaal weefsel kunnen passeren en een immunotoxisch effect kunnen veroorzaken en de rol daar in van neutrofielen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2.

Er vindt een deels beperkte en deels aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met mild ongerief voor 620 dieren en voor 4214 met matig ongerief.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat er een goede risico inschatting gemaakt kan worden voor blootstelling aan microplastics in de mens en dat meer kennis verkregen zal worden over de rol van de neutrofielen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen voor fundamenteel onderzoek en onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3.

Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het bepalen van het gezondheidsrisico aan blootstelling van microplastics met het uiteindelijke doel om overheden, publiek en fabrikanten te informeren over potentieel schadelijke microplastics en indien noodzakelijk regelgeving aan te passen en meer kennis op te doen over de effecten van microplastics die epitheliaal weefsel kunnen passeren en een immunotoxisch effect kunnen veroorzaken en de rol daar in van neutrofielen een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de grotendeels aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de

gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, waarbij het quorum wel werd behaald. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. Een ander DEC-lid onthoudt zich van stemming, omdat deze zich niet kan vinden in de focus op neutrofielen zonder de interactie met macrofagen hierbij te betrekken. De focus zou meer gericht moeten zijn op interactie macrofagen, welke als eerste in contact zullen komen met de microplastics en de activiteit van neutrofielen mede kunnen bepalen.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

Er is uitgebreid gediscussieerd, waarom de onderzoekers zich richten op de rol van de neutrofielen als de macrofagen als eerste betrokken zijn bij de immuunrespons? Samengevat ligt de focus van de aanvraag op het inschatten van het risico aan blootstelling van microplastics bij de mens, maar omdat de onderzoekers zelf veel onderzoek doen naar de rol van neutrofielen zijn die uitkomsten voor hen ook interessant. Het belang van de risico's voor mens en dier zijn zwaarwegend geweest bij de eindafweging voor de DEC.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
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 beoordelvragen verstrekt u een heldere onderbouwing. De ethische afweging volgt op logische wijze uit de beantwoording van de C vragen.
De aanvrager geeft aan voor een deel van het onderzoek (na toediening van LPS en bacteriën) geen gebruik te maken van verdoving/pijnbestrijding bij een ontstekingsreactie. De CCD had de visie hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.
In uw advies onder E geeft u aan dat het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt en formuleert u een knelpunt dat tijdens de behandeling van dit dossier naar voren is gekomen. Onder deze punten geeft u aan dat een knelpunt is geweest dat de focus van de aanvraag ligt op neutrofielen en niet op de rol van macrofagen. De aanvrager geeft aan dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste aanwezig zullen zijn bij de microplastics in het lichaam. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat ook data over macrofagen zal worden verzameld om de rol van macrofagen bij de reactie op microplastics in het lichaam te bestuderen.

### 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.

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>		
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 87,2% Matig 12,8% Licht	

---

 Nummer: 1      Auteur: [5.1 lid2e](#)      Onderwerp: Notitie Datum: 28-4-2023 14:31:00  
U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden.

## 5 Samenvatting

# 5.2 lid1

De <sup>1</sup>aanvraag heeft aangegeven dat na het induceren van een ontstekingsreactie bij een deel van de dieren geen pijnbestrijding zal worden toegepast. De aanvrager geeft aan dat pijnbestrijding invloed kan hebben op de te onderzoeken immuunreactie. <sup>2</sup>5.2 lid1

De DEC baseert haar advies op een meerderheidsstandpunt. Één van de DEC-leden heeft zich onthouden van stemming omdat dit lid zich niet kon vinden in de focus van de aanvraag op neutrofielen zonder de interactie van macrofagen te bekijken. Het DEC-lid geeft ook aan dat de focus van het onderzoek meer zou moeten liggen op de macrofagen, omdat deze als eerste in contact zullen komen met de microplastics in het lichaam. Dit punt is ook geformuleerd als knelpunt voor de DEC. De aanvrager (een expert op het <sup>3</sup>bied van neutrofielen) beschrijft in het projectvoorstel dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste in aanraking zullen komen met de microplastics in het lichaam. Daarnaast beschrijft de aanvrager ook data te verzamelen over de rol van de macrofagen in de immuunrespons op microplastics. <sup>4</sup>5.2 lid1

## 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

## Pagina: 6

---

 Nummer: 1 aanvrager	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 28-4-2023 14:33:43
 Nummer: 2 onderbouwd	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 28-4-2023 14:34:09
 Nummer: 3 gebied	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 28-4-2023 14:34:41
 Nummer: 4 Door de expertise van de aanvrager op het gebied van neutrofielen	Auteur: 5.1 lid2e	Onderwerp: Markering	Datum: 28-4-2023 14:37:44

---

5.2 lid1





# Advies aan CCD

Datum 28 april 2023  
 Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216420

Instelling: 5.1 lid2h  
 Onderzoeker: 5.1 lid2e  
 Project: Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system  
 Aanvraagnummer: AVD202216420  
 Betreft: Nieuwe aanvraag  
 Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
 Bescherming van het milieu

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	<p>De aanvraag was in een eerder stadium door de DEC beoordeeld als niet-toetsbaar. Na aanpassingen van de door de DEC aangehaalde punten is de aanvraag opnieuw aangeboden aan de DEC en heeft zij hier advies over uitgebracht.</p> <p>Er zijn vragen gesteld aan de aanvrager.</p> <p>Vraag over de NTS:      De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?</p> <p>Vraag over het aanvraagformulier:      De door u gewenste startdatum ligt inmiddels in het verleden. Mocht u de gewenste start- en einddatum willen herzien, kunt u dit doen door een nieuw, ondertekend aanvraagformulier met aangepaste start- en einddatum in te dienen.</p> <p>Vraag over de bijlage dierproeven:      In de bijlage dierproeven onder 'E. Humane endpoints' noemt u dat ernstige kortademigheid bij de dieren wordt gezien als humaan eindpunt. Kunt u dit specificeren en aangeven hoe lang u dit criterium zult aanhouden voordat een humaan eindpunt zal worden bereikt?</p>
---------------	---

Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>				
	Muizen (Mus musculus)	GGO	4.834	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

### Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

#### 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls

Citaat:

Some pain is expected to occur for:

- acute inflammatory response after LPS administration
- acute inflammatory response after bacterial administration

These acute inflammatory response will evoke fever, shivers and muscle ache. Anelgesia will influence the immune response that we are studying. We also perform these type of studies in human volunteers without anesthesia or analgesia.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls

Muizen (Mus musculus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

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

### 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat B4: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.</p> <p>Citaat C1: De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De geschreven aanvraag is in de huidige vorm begrijpelijk opgesteld, navolgbaar in de onderzoeksvragen en hoe deze zijn vertaald in de diverse experimenten en daardoor toetsbaar geworden. De onderzoekers maken deel uit van een groter Nederlands consortium, dat gefinancierd wordt door de overheid. Het gehele onderzoek is verdeeld in verschillende delen per deelnemer van het consortium. De aanvragers zullen hun aandeel onderzoeken: wat de risico's zijn van blootstelling van microplastics bij de mens. Er zal door de aanvragers worden onderzocht wat de effecten in-vivo zijn, nadat andere partners de karakterisatie en de in-vitro blootstellingen hebben onderzocht.</p>
-------------------	---

Het eerder beschreven fundamentele onderzoek naar specifieke rol van neutrofielen is er uit gehaald. Maar de onderzoekers zullen hun kennis van neutrofielen benutten om de in-vivo experimenten uit te voeren. [...]

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk of het bepalen van het gezondheidsrisico aan blootstelling van microplastics met het uiteindelijke doel om overheden, publiek en fabrikanten te informeren over potentieel schadelijke microplastics en indien noodzakelijk regelgeving aan te passen en meer kennis te verzamelen over de effecten van microplastics, die epitheliaal weefsel kunnen passeren en een immunotoxisch effect kunnen veroorzaken en de rol daar in van neutrofielen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2.

Er vindt een deels beperkte en deels aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met mild ongerief voor 620 dieren en voor 4214 met matig ongerief.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat er een goede risico inschatting gemaakt kan worden voor blootstelling aan microplastics in de mens en dat meer kennis verkregen zal worden over de rol van de neutrofielen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen voor fundamenteel onderzoek en onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3.

Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het bepalen van het gezondheidsrisico aan blootstelling van microplastics met het uiteindelijke doel om overheden, publiek en fabrikanten te informeren over potentieel schadelijke microplastics en indien noodzakelijk regelgeving aan te passen en meer kennis op te doen over de effecten van microplastics die epitheliaal weefsel kunnen passeren en een immunotoxisch effect kunnen veroorzaken en de rol daar in van neutrofielen een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de grotendeels aanzienlijke aantasting van het

welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, waarbij het quorum wel werd behaald. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. Een ander DEC-lid onthoudt zich van stemming, omdat deze zich niet kan vinden in de focus op neutrofielen zonder de interactie met macrofagen hierbij te betrekken. De focus zou meer gericht moeten zijn op interactie macrofagen, welke als eerste in contact zullen komen met de microplastics en de activiteit van neutrofielen mede kunnen bepalen.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

Er is uitgebreid gediscussieerd, waarom de onderzoekers zich richten op de rol van de neutrofielen als de macrofagen als eerste betrokken zijn bij de immuunrespons? Samengevat ligt de focus van de aanvraag op het inschatten van het risico aan blootstelling van microplastics bij de mens, maar omdat de onderzoekers zelf veel onderzoek doen naar de rol van neutrofielen zijn die uitkomsten voor hen ook interessant. Het belang van de risico's voor mens en dier zijn zwaarwegend geweest bij de eindafweging voor de DEC.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
<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. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden.</p> <p>De aanvrager geeft aan voor een deel van het onderzoek (na toediening van LPS en bacteriën) geen gebruik te maken van verdoving/pijnbestrijding bij een ontstekingsreactie. De CCD had de visie hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.</p> <p>In uw advies onder E geeft u aan dat het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt en formuleert u een knelpunt dat tijdens de behandeling van dit dossier naar voren is gekomen. Onder deze punten geeft u aan dat een knelpunt is geweest dat de focus van de aanvraag ligt op neutrofielen en niet op de rol van macrofagen. De aanvrager geeft aan dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste aanwezig zullen zijn bij de microplastics in het lichaam. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat ook data over macrofagen zal worden verzameld om de rol van macrofagen bij de reactie op microplastics in het lichaam te bestuderen.</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.
--

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>		
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 87,2% Matig 12,8% Licht	

## 5 Samenvatting

5.2 lid1

De aanvrager heeft aangegeven dat na het induceren van een ontstekingsreactie bij een deel van de dieren geen pijnbestrijding zal worden toegepast. De aanvrager geeft aan dat pijnbestrijding invloed kan hebben op de te onderzoeken immuunreactie. 5.2 lid1

De DEC baseert haar advies op een meerderheidsstandpunt. Één van de DEC-leden heeft zich onthouden van stemming omdat dit lid zich niet kon vinden in de focus van de aanvraag op neutrofielen zonder de interactie van macrofagen te bekijken. Het DEC-lid geeft ook aan dat de focus van het onderzoek meer zou moeten liggen op de macrofagen, omdat deze als eerste in contact zullen komen met de microplastics in het lichaam. Dit punt is ook geformuleerd als knelpunt voor de DEC. De aanvrager (een expert op het gebied van neutrofielen) beschrijft in het projectvoorstel dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste in aanraking zullen komen met de microplastics in het lichaam. Daarnaast beschrijft de aanvrager ook data te verzamelen over de rol van de macrofagen in de immuunrespons op microplastics. 5.2 lid1

## 6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

5.2 lid1

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

## 7 Concept beschikking voor akkoord CCD

---

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 28 april 2023 15:05  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**CC:** 5.1 lid2e  
**Onderwerp:** Aanhouden AVD 5.1 lid2h 202216420

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 23-09-2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216420. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### Welke informatie nog nodig

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

#### Niet technische samenvatting

De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?

#### Onduidelijkheden

De door u gewenste startdatum ligt inmiddels in het verleden. Mocht u de gewenste start- en einddatum willen herzien, kunt u dit doen door een nieuw, ondertekend aanvraagformulier met aangepaste start- en einddatum in te dienen.

In de bijlage dierproeven onder 'E. Humane endpoints' noemt u dat ernstige kortademigheid bij de dieren wordt gezien als humaan eindpunt. Kunt u dit specificeren en aangeven hoe lang u dit criterium zult aanhouden voordat een humaan eindpunt zal worden bereikt?

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....

Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789

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



**5.1 lid2h**

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

uw kenmerk  
ons kenmerk AVD **5.1 lid2h** 202216420

datum 12 mei 2023  
onderwerp Reactie onderzoek

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw mail d.d. 28 april 2023.

De onderzoeker heeft ervoor gekozen om het projectvoorstel aan te passen aan de NTS in plaats van andersom.

**5.1 lid2e****5.1 lid2h**



## Aanvraag

### Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

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

## 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in <span style="background-color: #cccccc; color: red; padding: 2px;">5.1 lid2h</span>																											
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																											
1.2	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3 <input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1 <input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2																											
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="3" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder</td> <td style="width: 15%;">Titel</td> <td style="width: 15%;">Voorletters</td> <td style="width: 15%;">Achternaam</td> <td style="width: 40%;"><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres contactpersoon</td> <td colspan="4" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)</td> <td>Titel</td> <td>Voorletters</td> <td>Achternaam</td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw</td> </tr> <tr> <td colspan="4">E-mailadres gemachtigde</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h			Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw	5.1 lid2e				E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2h				Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw	E-mailadres gemachtigde			
Naam instelling of organisatie	5.1 lid2h																												
Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder	Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw																									
	5.1 lid2e																												
E-mailadres contactpersoon	5.1 lid2h																												
Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)	Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw																									
	E-mailadres gemachtigde																												
1.3	Vul de gegevens van het postadres in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Straat en huisnummer</td> <td colspan="3" style="background-color: #cccccc; color: red; font-size: 2em;">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td colspan="3" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2h</td> </tr> <tr> <td>Postbus, postcode en plaats</td> <td colspan="3" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2h</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	5.1 lid2h			Postcode en plaats	5.1 lid2h			Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h																	
Straat en huisnummer	5.1 lid2h																												
Postcode en plaats	5.1 lid2h																												
Postbus, postcode en plaats	5.1 lid2h																												
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 30%; background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> <td style="width: 20%;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2" style="background-color: #cccccc; color: red;">5.1 lid2e</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	5.1 lid2e		Afdeling	5.1 lid2e		Telefoonnummer	5.1 lid2e																
(Titel) Naam en voorletters	5.1 lid2e	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																											
Functie	5.1 lid2e																												
Afdeling	5.1 lid2e																												
Telefoonnummer	5.1 lid2e																												

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum 1 - 6 - 2023 Einddatum (t/m) 31 - 5 - 2028
3.2	Wat is de titel van het project?	Immunological health effects of microplastics
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Schadelijkheid van microplastics
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC 5.1 lid2h Postadres E-mailadres

## 4 Factuurgegevens

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

5.1 lid2h

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

Ordernummer:

5.1 lid2h

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven 1
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). De ondergetekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

5.1 lid2h

Datum

- -

Handtekening



## Form

### Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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.	Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system

### 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 or routine production
	<input checked="" type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal
	<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 2.1.

The aim of this project is to understand the health risk posed by microplastics that we are exposed to on a daily basis. We work in both a Dutch and European consortium to look at all aspects of the risk of plastic exposure. The answers we find will guide the government in implementing stricter rules for plastic, based on how dangerous they are for our health.

Microplastics are everywhere in our environment, in our food, our water and in our air (see <https://youtu.be/YOEwRkbgm4A>). We are exposed to them in a more sterile form from sources like cosmetics and food packaging, but plastics in the environment are an attractive substrate for pathogens like bacteria to grow on and viruses to stick to. This biofilm of bacteria and viruses on the plastics can harbor antibiotic resistant bacteria<sup>1,2</sup>. These microplastics pose new challenges to our immune system and immune cells. Immune cells are the cells that deal with situations in our bodies like invasion of foreign intruders (e.g. bacteria, fungi, and all sort of foreign particles, probably including plastics), but also problematic cells. Researchers from Amsterdam have found microplastics in our bloodstream<sup>3</sup>. Unfortunately, they could not determine if the plastics in the bloodstream were free-floating, or were taken up by immune cells. We have done preliminary mouse work where we injected green fluorescent plastics, and found that the majority of plastics accumulated in a few specific organs. We saw that the plastics were taken up by immune cells, and we were also able to determine which immune cells take up the most plastics. So we know that immune cells indeed interact with the plastics, but we miss a lot of information on how exactly immune cells and plastics interact and what health effects this could have.

**We need to determine:**

- whether humans are able to clear the plastics after they cross into our bloodstream, or
- whether they accumulate in our organs, in and between our cells, over our lifetime.
- whether the plastics that remain in our bodies result in chronic or acute inflammation, act like asbestos fibers and link to cancer.
- whether plastics made of different chemical compounds have different effects on our body, and what the size limitations of plastics for crossing different epithelial barriers are.

The **5.1 lid1c** consortium **5.1 lid1c**, funded by our government, connects Dutch research groups that are experts in their field to investigate plastics and their risk to our health. This large research question is divided in parts as indicated below (fig.1). We are the group that will perform all animal experiments in WP3 and WP4: exposure assessment and hazard assessment. The information from the experiments done by us and the others will contribute to each other's findings and into risk assessment and developing solutions. In WP3 and 4 we work together with other experts on innate immune cells, and experts in specific tissues like the lungs/brain barrier/placenta barrier/intestines. We are the experts concerning neutrophils. (all workpackage leaders and research partners can be found on the **5.1 lid1c** website). Because we collaborate with experts in such diverse subjects, we get the most out of our mouse experiments. Together, we can analyze all parts of the mice from our experiments.

5.1 lid2f

Figure 1. Schematic representation of the structure of the **5.1 lid1c** consortium. The big question of the risk of plastic exposure is divided in smaller questions. For each sub question a group of experts is assembled to get a broad perspective. All parts communicate to come to a risk assessment and come up with solutions for plastics exposure. **5.1 lid1c**

All laboratories use plastics for all procedures and analyses, and so plastics contamination is everywhere. The researchers in Amsterdam built a lab specifically with only glass and metal to prevent this contamination in their experiments. Our solution to this problem of contamination from the environment is the use fluorescent particles provided by [5.1 lid2b](#) consortium partners, because they are clearly distinguishable from contamination.

Since we are examining the active uptake of plastics in our body and the response of the immune cells, we need to work with live material. Dead human material can only verify the presence of microplastics, but it will not show uptake of plastics from food or inhalation, it will not show how and where plastics distribute in time, it will not have an immune response to plastics. Therefore we need to perform mice experiments to determine the health risk. **The questions that need to be answered are questions that unfortunately cannot all be resolved with *in vitro* systems, not even organoids will be complex enough.** Because testing plastics on one type of immune cell at the time will not show the full immune response nor the dynamics in time and location. And by testing plastics on an artificial epithelial linings, we will miss important other cells that have an effect on plastic uptake (like M cells in the gut and alveolar macrophages in the lung).

So far, we have done what we can to investigate the effects of microplastics. We have isolated human immune cells from willing donors and exposed them to commercially bought/made microplastics. These are perfect spheres of one size and one material. This preliminary data showed that immune cells can eat the commercial plastics, but this can cause them to die. This seems to depend on the size and amount of plastics. Consortium partners have been doing comparable preliminary experiments for the other tissues mentioned before. Real-life plastics can be of various materials and can be of very different shapes, influencing their effects on cells. We have access to unique plastics produced by [5.1 lid1c](#) that resemble what we are exposed to daily, which are currently being tested. Results from us and our partners concerning these [5.1 lid1c](#) plastics will determine what plastics need to be tested in mice. For example, we have found toxic effects on human neutrophils *in vitro* of <1 µm and 1-5 µm PVC, but not of similar size nylon particles. Therefore it would be highly relevant to compare their *in vivo* effect on neutrophils.

In the consortium we are the experts on neutrophils, and as the most abundant white blood cell, neutrophils are the most likely cells to interact with microplastics after they have entered our bloodstream. Our lab has done numerous discoveries when it comes to neutrophil biology. For example, we identified different neutrophil subsets and have an idea of their role in different diseases<sup>4-8</sup>. We will combine our expertise on neutrophils with our experience in performing mouse experiments to study the innate immune system. Neutrophils respond much faster than other phagocytes, but they are not the most effective cleaning crew of our immune system. Those would be the macrophages. It takes time for monocytes to arrive at the site of the problem, and then differentiate into a functional monocyte-derived macrophage. Monocytes and macrophages are cell types that we only recently started working with in this project, because of how important they are. But we are not yet experts on these cell types, so this will be a learning opportunity for us to learn from our consortium partners that are experts on these cells. By combining our expertise in mouse experiments and neutrophils, with their expertise in other phagocytes, we hope to provide a complete picture of the immune system's response to microplastics.

**By comparing the reaction of the immune system to foreign bodies like plastics to acute and chronic inflammation, we will be able to determine the health risks associated with our exposure to microplastics.**

#### References

1. Qiang L., Cheng J., Mirzoyan S., Kerkhof L., Häggblom M. Characterization of Microplastic-Associated Biofilm Development along a Freshwater-Estuarine Gradient. *Environ Sci Technol.* 2021 Dec 21
2. Guo X., Sun X., Chen Y., Hou L., Liu M., Yang Y. Antibiotic resistance genes in biofilms on plastic wastes in an estuarine environment. *Sci Total Environ.* 2020 Nov 25
3. Leslie H., Van Velzen M., Brandsma S., Vethaak A., Garcia-Vallejo J., Lamoree M. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ Int.* (2022)
4. Maskrey, B. H., Megson, I. L., Whitfield, P. D. & Rossi, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1001-1006 (2011).

5. Moses, K. & Brandau, S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin. Immunol.* **28**, 187-196 (2016).

6. Kaplan, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 219 (2013).

## 5.1 lid2e, 5.1 lid2h

### 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

As stated before, the goal of this project is to determine the health risk of microplastics exposure, this so the government can make informed decisions on plastic regulations. This is primarily aimed at single use packaging used in daily life. Future research will build from there and look more into specific situations of large amounts of plastic used, like in health care, where it might be more difficult to switch to plastic-free.

**5.1 lid1c** has the goal to determine the health risk of the different types of plastics we are exposed to daily, looking into the effects of different materials/polymer types, sizes and shapes. This goal, together with our expertise and interest in the immune system, gives us the **goal of this proposal: determine the health risk of plastics exposure, based on the plastics' potential to cross epithelial linings, their dispersion throughout the body, the immuno-toxicological effects, and their persistence in the body.**

We hypothesize that the neutrophils will be the first to respond to the presence of plastic in our body, followed by other immune cells to continue the immune reaction. Our expertise in neutrophil biology and their response to natural cues like infection and inflammation gives us a frame to understand how neutrophils react to microplastics. This will also help determine the health risks of microplastics.

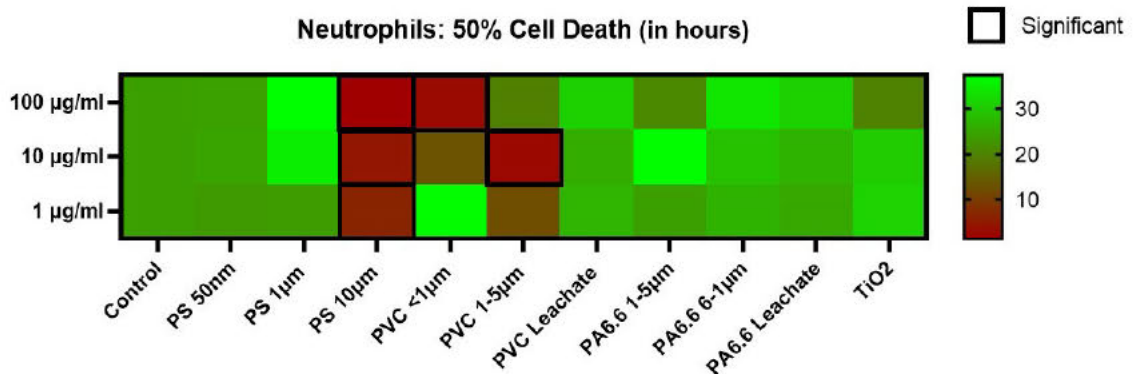
The focus of this proposal is on microplastics: determine the health effects of exposure to different and environmentally relevant microplastics. We will investigate the dynamics and effects of plastics: which polymers are taken up, and by gut and/or lung epithelium, does size matter, does shape matter, does dosage matter, where do they go, and what effect do they have there. Most questions concerning the dynamics and risk of plastic exposure have not been answered yet, or are answered only with machine made, perfectly round and smooth polystyrene particles that are coated with chemicals, specific only for that production process. With these plastics, we have done oral exposure and saw that 10 days is necessary to have enough plastics in the mouse in order to find a handful back in the blood. From injecting the microplastics intravenously we know that they accumulate in the liver and spleen, and a bit in the bone marrow. We also confirmed that it's both the neutrophils and different types of macrophages that take up these plastics.

The polystyrene particles do not resemble the plastics we are exposed to in real life, not in size, shape, polymer or coating. The microplastics we are about to test are made by **5.1 lid1c** from a selection of the most used plastics in our daily life, to resemble our daily exposure. They are also made fluorescently green, so we can find them back with relative ease anywhere in the mouse. This way we can distinguish the intentionally administered plastics from the standard daily exposure plastics in the mice (a contamination that is impossible to prevent, because everything in the mouse stables is plastic or packaged in plastic). These fluorescent microplastics administered to mice will show us when, where and how they get into our system, and the effects they will have on our health.

The go/no go criteria are:

- Only plastic polymer types found to have an effect *in vitro* on human neutrophils (for example because they are taken up by them, they induce cell death or the release of inflammatory molecules) will be tested *in vivo* but will be compared to a negative control particle that doesn't show toxicity.
- If the majority of our consortium partners finds no effect of a certain plastic in their *in vitro* studies, they will not be tested in mice unless when used as a negative control.





Example how in vitro results act as go/no go for in vivo experiments.

In the figure human neutrophil toxicity was tested in vitro for different MOMENTUM microplastics.

The positive control microplastics PS 10µm are toxic as are the PVC <1µm and 1-5µm, other plastics do not show toxicity.

Based on this data it would be of interest to compare the in vivo neutrophil response of PVC 1-5µm to PA6.6 1-5µm in mice since these are similar sizes that show a very different toxicity in vitro.

- Endothelial exposure & translocation experiments will be performed first with (polystyrene) particles of well characterized sizes. Size ranges of particles that don't cross the barriers will not be tested further and can be excluded, because only particles that cross the barrier are physiologically relevant for answering the other questions.

Proposal goal: Determine the health effects of environmental exposure to microplastics

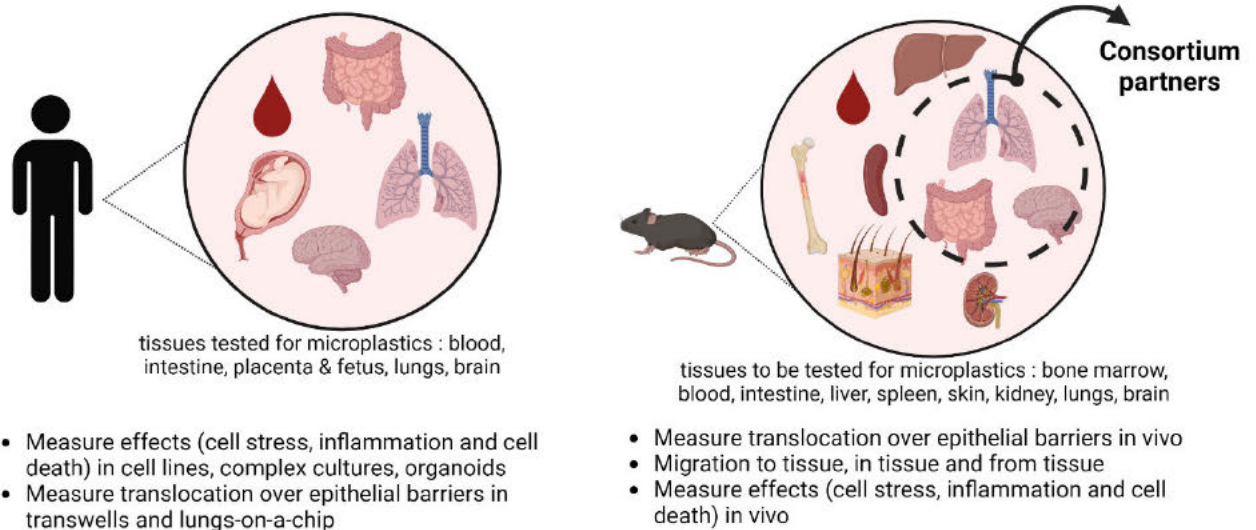


Figure 2. Schematic clarification of the experiments that can and are performed in human (left), and the experiments we have been performing and intent to perform in mice (right). Tissues within the inner circle will be offered to consortium partners to resolve their research questions within the consortium. (Created with Biorender.com)

Overall goal: Determine the health effects of environmental exposure to microplastics

Subquestions

1. Establish whether oral administration or inhalation of microplastics results in inflammation at the site of most-likely epithelial transfer (gut for oral, lung for inhalation)
2. Determine whether oral administration or inhalation of microplastics results in translocation to the circulation and to other organs like liver, spleen and kidneys
  - a. Trafficking between organs in time
  - b. Role of immune cells in transporting microplastics throughout the body
3. Determine if the presence of microplastics in blood or tissues induces inflammation

4. Determine if phagocytosis (engulfment of microplastic particles by immune cells) occurs in the bloodstream and/or in tissues
5. Determine the effect of (micro)plastics on immune cell function on:
  - a. Survival
  - b. Migration
  - c. Bacterial killing of for example staphylococcus or pseudomonas family members
6. Compare the effects of microplastics to other inflammatory stimuli, in order to place the effect in the right perspective

The health risk of microplastics doesn't solely depend on their effect on neutrophils, even though they are high in number and quick to respond. The health risk is not only depending on our neutrophils findings, we will also gather data on the other phagocytic and primary immune cells, primarily monocytes and macrophages. These outcomes will be discussed with experts that are part of the 5.1 lid1c consortium to make the complete picture of exposure and risk. Determining the effect of microplastics on monocytes and macrophages can be done post mortem in most cases, and will be done in parallel to analyzing the effect on neutrophils in mice. The handful of experiments focused on macrophages will be performed in the same set-up as the neutrophil focused experiments and will not cause additional discomfort.

**Our project is partly observational and any of the evidence collected, positive or negative, will answer open toxicological questions for which answers are at the moment not available.** A potential negative result (in the presence of positive controls) will not undermine our project but rather provide the public, government and companies with (reassuring) experimental evidence that is currently lacking.

### 3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

In healthy mice, mice with acute inflammation and mice treated with plastic, we will analyze the phenotype and function of the immune cells *ex vivo*, crucially supported by analysis of the kinetics of immune cells *in vivo*. *Ex vivo* analysis is aided by our longstanding experience with flow cytometry and assays on neutrophil function (migration, phagocytosis, ROS formation, degranulation, etc.). In the kinetic studies we will examine the distribution of immune cells by *ex vivo* analysis of the neutrophils in different organs, as well as the migration of neutrophils by intravital imaging. In these intravital imaging experiments, neutrophil migration is easily tracked in mice that produce fluorescent neutrophils such as the LysM-GFP or the Catchup<sup>IVM</sup> mouse<sup>9, 10</sup>.

Until now we and others in the microplastic field have used polystyrene perfect spheres of an exact size bought from a company. During this fabrication process a coating is formed on the plastic spheres that is not present on plastic we are exposed to daily. Currently we are testing the more environmentally relevant microplastics provided by our consortium partners *in vitro* with human immune cells. Real life plastics of 3 different plastic materials were milled to better reflect microplastics in the environment. Disadvantages are that the size ranges are broad and we don't have a lot of material compared to the fabricated polystyrene particles.

5.1 lid2f

These data demonstrate we have the experimental expertise to perform the project and also urge the research proposed in this project.

There are several other reasons why we are confident that we can achieve our aims: Our group is embedded in the 5.1 lid1c

rovides core facilities for various high-end techniques such as histology, fluorescent confocal imaging, intravital imaging and flow cytometry. Moreover, the animal facility offers dedicated staff providing the regular housing of the animals and support and counsels the scientist in their experiments. Within our group, only trained and experienced people perform experiments.

Our research and experiments are constantly evaluated within our group, and by various other groups within our institute and campus. To aid our research on microplastics, we collaborate with experts from different fields in the 5.1 lid1c and 5.1 lid1c consortia. Over the last few years, we have built up a repertoire of state-of-the-art *in vivo* imaging techniques to study immune cells in living mice. This has led to many new

discoveries and breakthroughs published in scientific journals<sup>11-17</sup>. Our research is funded by major funding agencies. Our embedding in an excellent scientific environment, our unique techniques and approaches, and our previous achievements make it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

#### References

9. Hasenberg, A. et al. *Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes*. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).

10. Peters, N. C. et al. *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies*. *Science* **321**, 970-974 (2008).

# 5.1 lid2e, 5.1 lid2h

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 en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

[Click or tap here to enter text.](#)

### 3.3 Relevance

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

Understanding the body's reaction to exposure of particles like plastic has both scientific and societal importance. Preliminary results of research done by others has shown the presence of microplastics in our own bloodstream. From the bloodstream they end up in our organs. It is unlikely that these foreign particles will be ignored by our immune cells. To date there is no hard evidence for hazards of microplastics to our health. Thus, we have no clear indication whether exposure needs to be prevented. This multi-disciplinary study can be used as a guide for future research on particle exposure, hopefully reducing the experiments necessary for future questions. The societal relevance lies in the problem that we are constantly exposed to particles of which we have no idea what it does to our health. **Giving conclusive evidence whether plastic polymer type, size, shape or amount matters in the negative health effects makes it easier for government officials to install laws to limit this**, like already has been done for smoking.

We are part of a Dutch consortium called **5.1 lid1c** which was set up with aid of the government because it was recognized how **worryingly little is known about the health effects of microplastics**. Within this consortium, plastics found in our environment, food and water will be tested in/on all important tissues: the lungs, the gut, the placenta, the brain, and of course the immune system. **If these plastics are detrimental to our health, regulations should be put in place in regards to the production, usage, and recycling and disposal of those plastics.**

We therefore aim to characterize if microplastics can induce inflammation and if so what important characteristics are and at what dose.

In addition to lack of hazard data, citizens generally do not see the microplastic pollution that is caused by their use of plastics, nor are they aware of the negative environmental and health effects of microplastics. The result is that there is little incentive for citizens to use plastic-free products or to limit plastic waste through their consumption practices. **Knowledge on plastic health effects leads to awareness, and is**

**an essential step to empower the public to make changes in their households, demand changes from industry, and demand action from political representatives.**

Our work will also have impact on science performed in the industrial setting. We collaborate with the textile industry (Inditex) who study machines that capture fibers from textiles before they leave the factory, thereby preventing shedding during daily use by citizens. In addition, they can design and test textiles that shed fewer fibers to begin with. In addition we work with air filter companies who might reduce microplastic concentrations in the household.

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

Mice are the obvious first stakeholders. They are undergoing scientific experiments beyond their own control. Their interests are the three Rs: Replacement, Reduction and Refinement (further defined in "Description animal procedures").

In principle the whole human population is a stakeholder. We are all exposed to microplastics. The environment as a whole can also be considered a stakeholder, because if we find effects on our health and the health of mice, obviously other animals will be affected. The industry producing plastics and plastic alternatives are stakeholders too. **The findings in our research can lead to legislation, potentially banning the use of certain plastic types for certain products or altogether.** We perform unbiased and independent research, and report our progress and results to ZonMW as well as publish in internationally acknowledged journals

We fully intend to capitalize on the networks that we have through multiple consortia as needed to achieve our scientific objectives and to amplify our societal impact. These can also be considered stakeholders. For example, we collaborate with **5.1 lid1c**. Achieving societal changes based on our research findings will require the engagement and inclusion of the communities in which we conduct our research, patient organizations, industry players, local and national governing bodies, and non-governmental organizations (NGO). The consortia we take part in have representation of these communities and parts of society.

**Longfonds** is very interested in the outcome of our study as microplastics enter our body through inhalation. Their network and their outreach activities will help to spread awareness about microplastics and their lobbying network will help to involve government officials in our fight against microplastics.

The **Plastic Soup Foundation** is an international organization that focuses entirely on reducing plastic pollution. Their involvement will help to ensure that our findings are shared widely with the general public (including school children), as well as via their vast network of industrial, political and scientific stakeholders. They are also looking into practical solutions.

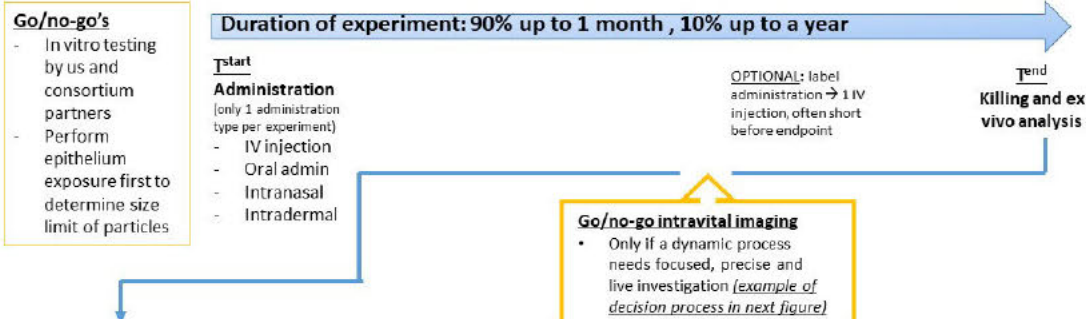
We are currently trying to acquire funding for a collaboration with the citizen network, **Onzelucht.nl**. This network consists of thousands of households to measure outdoor air quality, providing raw data to **5.1 lid1c** working together with local governments, in schools and with both rural and urban communities.

Additional regulatory organizations, like the Dutch ministry of Infrastructure and Water Management, Science Advice for Policy by European Academies (SAPEA) and the World Health Organization (WHO) will also be important to reach out to as we expand our networks and disseminate our findings.

### 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.

## Majority of experiments (90% of animals used)



## Limited number of experiments (10% of animals used)

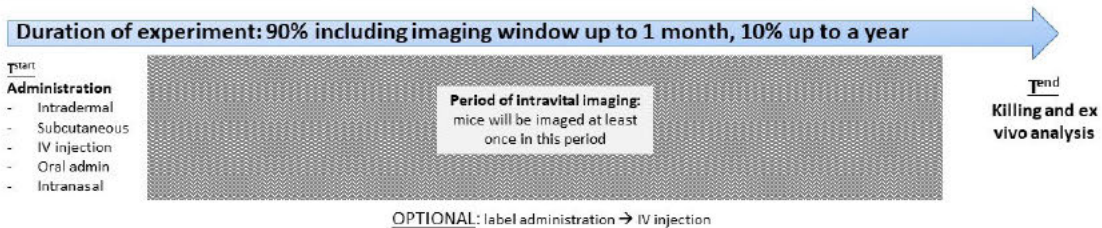


Figure 3. schematic overview of the general designs of the experiments and the questions they will answer. As indicated will the majority of the experiments be performed in a simple set-up: one route of administration, with only the option of label administration (like a CD45 antibody). Only if the results from these experiments raises questions about specific details of the dynamics, will intravital imaging be performed.

## Example intravital go/no-go decision

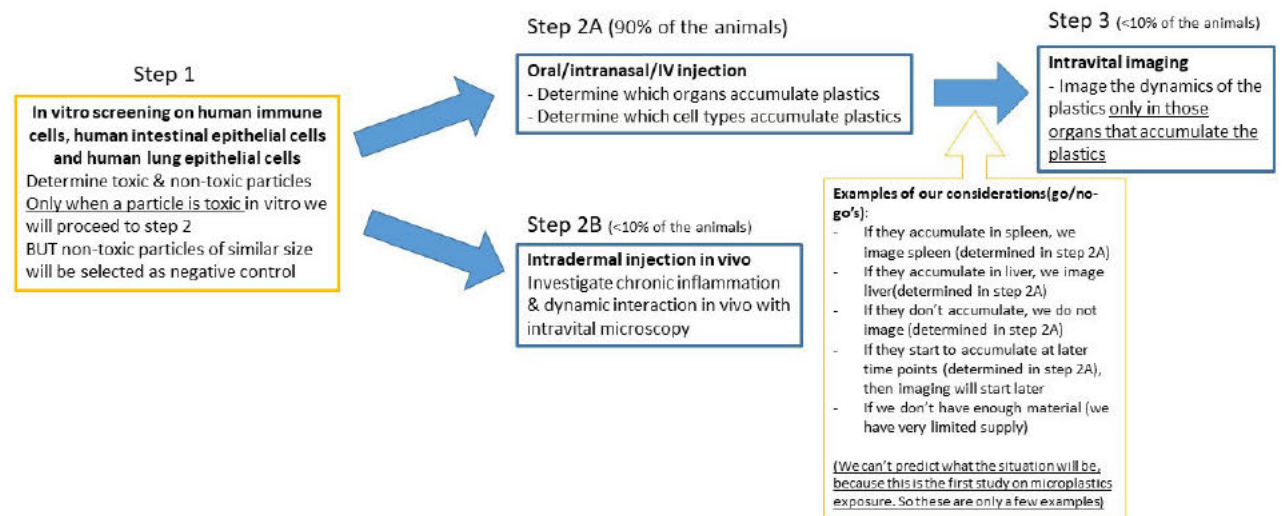


Figure 4. schematic overview of the go/no-go decision process for performing intravital imaging. Based on the in vitro findings we will do, we will expose mice to these plastics. The majority of animals will only receive oral/intranasal/IV plastics. These experiments will be used for in vivo toxicity confirmation, and also to determine which organs will be

imaged in intravital imaging and which cells to focus on. The plastics determined toxic in vitro will also be tested for long term immunological effects and easy-access dynamics with intradermal injection and imaging.

The strategy of this project is to combine human *in vitro* experiments with murine *ex vivo* and *in vivo* experiments. The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data (decision making process in fig. 4)
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load).

The experimental set-ups and readout parameters will be the same for all experiments in this proposal (fig. 3), but the immune stimulating action or compound will differ per experiment (fig.5). Naturally, the different types of plastic particles will need to be tested by itself, or in combination with another action or compound, as stated below (fig.5). But also plastics with biofilm as explained earlier will need to be tested, because that is the status of the plastics we would find in the environment. In mice we are also able to do intravital imaging, where we can look in a live mouse and see the real time neutrophil response. But this is labor intensive, so it will only be performed if the results from the exposure require more elucidation (fig. 4). Intravital imaging will also be performed in the way that gives least discomfort and most easy to perform. Intradermal and subcutaneous injection keeps the plastics within easy reach of imaging with the microscope, and are less invasive procedures to perform.

One hypothesis is that characteristics like the surface texture, shape, and chemicals bound to the surface of the plastics will determine the response of our system to the plastics. As a control for these characteristics we will take along an equally non-degradable particle that is of a different material than plastic. The act of injection makes a wound, which in and of itself is an activating signal for neutrophils. Therefore we need to take a sterile injection along as a control for injection experiments.

Immune stimulating action/compound	By itself or in combination	What will be determined:
Plastic particles	By itself (mainly)	- Effect on inflammation - Translocation - Distribution - Effect on immune cell function
	Bacterial infection (positive control)	- Check if phagocytosis of microplastics prevents phagocytosis of bacteria (terminal exp) - Compare the effects of microplastics to other inflammatory stimuli to place the effect in the right perspective
	Sterile injury (negative control)	- Establish if immobilized immune cells that have engulfed microplastics can be prompted to mobilize and distribute plastics upon local inflammation (terminal experiment)
	LPS injection (positive control)	- Establish if immobilized immune cells that have engulfed microplastics can be prompted to mobilize and distribute plastics upon systemic inflammation (terminal experiment)
	Non-plastic inert materials (injected particle reference)	- Effect on inflammation - Translocation - Distribution - Effect on immune cell function
Plastic particles with biofilm	By itself (only)	- Establish whether a defective response to bacteria on plastic contributes to infections found in patients in vivo

Figure 5. Table giving an overview of the intended action to induce an immune response, whether other controls will/need to be taken along, and what will be determined from the experiment.

We use LPS in these questions to mimic a bacterial infection or sepsis, without actually injecting the bacteria. This will be one of the positive controls to compare the reaction of the neutrophils to: do they respond to

microplastics as they would to a systemic bacterial infection? It has the same effect as injecting bacteria, but it is more controlled. Where necessary we will be injecting bacteria as the positive control instead of LPS. This way we can compare the two and determine if plastics induce the same immune response as bacteria. In order to determine whether the microplastics are as inert as we always believed they would be, they will be compared to particles that have been proven to be inert.

As already explained above, for most experiments we first consider *ex vivo* experiments (mild discomfort) and terminal experiments, before we consider repetitive intravital imaging experiments (moderate discomfort). In some experiments we first consider repetitive intravital imaging, either because some questions can only be answered by imaging the same tissue over multiple imaging sessions, or because it significantly reduces the number of required mice. After completion of the intravital imaging experiments, cells, tissues and organs will be isolated and analyzed to reduce the number of mice required. We have done intravital imaging in the past and have the set-up for most experiments already up and running.

### 3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

The set-up might seem a bit broad, but the research into the effects of microplastics is so new that there is little previous data or other work to base a more fine-tuned approach on. The methods for obtaining the readout parameters will be the same for all experiments in this proposal. We think that by comparing the effects of microplastics to the proper controls (several inflammatory stimuli) is the strength of this project. Supported by our own research on human material, pigs and mice, and the minimal amount of information we do have on the microplastics themselves and their effects, we have a number of hypotheses that we will start with. However, since our research is extremely novel, we cannot know whether these hypotheses will prove correct. In the next five years, human data will be combined with data from the animal experiments to adapt our hypotheses when necessary. Our data will be combined with data from our **5.1 lid1c** colleagues, population exposure data and exposure data from volunteers to help the setting up of plastics regulations by local and global government.

### 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	Microplastics exposure versus control
2	Click or tap here to enter text.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



# Advies aan CCD

Datum 12 mei 2023  
Betreft Advies Secretariaat over Aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD202216420

Instelling: 5.1 lid2h  
Onderzoeker: 5.1 lid2e  
Project: Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system  
Aanvraagnummer: AVD202216420  
Betreft: Nieuwe aanvraag  
Categorieën: Fundamenteel onderzoek  
Translationeel of toegepast onderzoek  
Bescherming van het milieu

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

Deze aanvraag is minder diepgaand getoetst vanwege een kwalitatief goed DEC-advies.

<b>Proces</b>	<p>De aanvraag was in een eerder stadium door de DEC beoordeeld als niet-toetsbaar. Na aanpassingen van de door de DEC aangehaalde punten is de aanvraag opnieuw aangeboden aan de DEC en heeft zij hier advies over uitgebracht.</p> <p>Er zijn vragen gesteld aan de aanvrager.</p> <p>Vraag over de NTS: De doelcategorieën van uw NTS komen niet overeen met de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel. Kunt u deze in met elkaar overeenstemming brengen?</p> <p>Vraag over het aanvraagformulier: De door u gewenste startdatum ligt inmiddels in het verleden. Mocht u de gewenste start- en einddatum willen herzien, kunt u dit doen door een nieuw, ondertekend aanvraagformulier met aangepaste start- en einddatum in te dienen.</p> <p>Vraag over de bijlage dierproeven: In de bijlage dierproeven onder 'E. Humane endpoints' noemt u dat ernstige kortademigheid bij de dieren wordt gezien als humaan eindpunt. Kunt u dit specificeren en aangeven hoe lang u dit criterium zult aanhouden voordat een humaan eindpunt zal worden bereikt?</p>
---------------	--



Naam proef	Diersoort	Stam	Aantal dieren	Herkomst
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>				
	Muizen (Mus musculus)	GGO	4.834	Dieren die voor onderzoek gefokt zijn

### Onverdoofd gebruik terwijl verdoving wel gewenst

#### 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls

Citaat:

Some pain is expected to occur for:

- acute inflammatory response after LPS administration
- acute inflammatory response after bacterial administration

These acute inflammatory response will evoke fever, shivers and muscle ache. Anelgesia will influence the immune response that we are studying. We also perform these type of studies in human volunteers without anesthesia or analgesia.

### Gebruik van mannelijke en vrouwelijke dieren

#### 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls

Muizen (Mus musculus) Er worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt.

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

### 2 DEC advies

<b>DEC-advies</b>	<p>Citaat B4: Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.</p> <p>Citaat C1: De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De herschreven aanvraag is in de huidige vorm begrijpelijk opgesteld, navolgbaar in de onderzoeksvragen en hoe deze zijn vertaald in de diverse experimenten en daardoor toetsbaar geworden. De onderzoekers maken deel uit van een groter Nederlands consortium, dat gefinancierd wordt door de overheid. Het gehele onderzoek is verdeeld in verschillende delen per deelnemer van het consortium. De aanvragers zullen hun aandeel onderzoeken: wat de risico's zijn van blootstelling van microplastics bij de mens. Er zal door de aanvragers worden onderzocht wat de effecten in-vivo zijn, nadat andere partners de karakterisatie en de in-vitro blootstellingen hebben onderzocht.</p>
-------------------	--

Het eerder beschreven fundamentele onderzoek naar specifieke rol van neutrofielen is er uit gehaald. Maar de onderzoekers zullen hun kennis van neutrofielen benutten om de in-vivo experimenten uit te voeren. [...]

Ethische afweging van de DEC:

Citaat D:

1.

De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, namelijk of het bepalen van het gezondheidsrisico aan blootstelling van microplastics met het uiteindelijke doel om overheden, publiek en fabrikanten te informeren over potentieel schadelijke microplastics en indien noodzakelijk regelgeving aan te passen en meer kennis te verzamelen over de effecten van microplastics, die epitheliaal weefsel kunnen passeren en een immunotoxisch effect kunnen veroorzaken en de rol daar in van neutrofielen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2.

Er vindt een deels beperkte en deels aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met mild ongerief voor 620 dieren en voor 4214 met matig ongerief.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat er een goede risico inschatting gemaakt kan worden voor blootstelling aan microplastics in de mens en dat meer kennis verkregen zal worden over de rol van de neutrofielen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen voor fundamenteel onderzoek en onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3.

Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het bepalen van het gezondheidsrisico aan blootstelling van microplastics met het uiteindelijke doel om overheden, publiek en fabrikanten te informeren over potentieel schadelijke microplastics en indien noodzakelijk regelgeving aan te passen en meer kennis op te doen over de effecten van microplastics die epitheliaal weefsel kunnen passeren en een immunotoxisch effect kunnen veroorzaken en de rol daar in van neutrofielen een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de grotendeels aanzienlijke aantasting van het

welzijn en de integriteit van de proefdieren. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

Het DEC advies is Positief

Het uitgebrachte advies is niet gebaseerd op consensus.

Citaat E2:

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, waarbij het quorum wel werd behaald. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is één DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. Een ander DEC-lid onthoudt zich van stemming, omdat deze zich niet kan vinden in de focus op neutrofielen zonder de interactie met macrofagen hierbij te betrekken. De focus zou meer gericht moeten zijn op interactie macrofagen, welke als eerste in contact zullen komen met de microplastics en de activiteit van neutrofielen mede kunnen bepalen.

De volgende dilemma's zijn gesignaleerd door de DEC:

Citaat E3:

Er is uitgebreid gediscussieerd, waarom de onderzoekers zich richten op de rol van de neutrofielen als de macrofagen als eerste betrokken zijn bij de immuunrespons? Samengevat ligt de focus van de aanvraag op het inschatten van het risico aan blootstelling van microplastics bij de mens, maar omdat de onderzoekers zelf veel onderzoek doen naar de rol van neutrofielen zijn die uitkomsten voor hen ook interessant. Het belang van de risico's voor mens en dier zijn zwaarwegend geweest bij de eindafweging voor de DEC.

### 3 Kwaliteit DEC advies

<b>Kwaliteit DEC-advies</b>
<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. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden.</p> <p>De aanvrager geeft aan voor een deel van het onderzoek (na toediening van LPS en bacteriën) geen gebruik te maken van verdoving/pijnbestrijding bij een ontstekingsreactie. De CCD had de visie hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.</p> <p>In uw advies onder E geeft u aan dat het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt en formuleert u een knelpunt dat tijdens de behandeling van dit dossier naar voren is gekomen. Onder deze punten geeft u aan dat een knelpunt is geweest dat de focus van de aanvraag ligt op neutrofielen en niet op de rol van macrofagen. De aanvrager geeft aan dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste aanwezig zullen zijn bij de microplastics in het lichaam. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat ook data over macrofagen zal worden verzameld om de rol van macrofagen bij de reactie op microplastics in het lichaam te bestuderen.</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.
--

<b>Hergebruik</b>	Er is geen sprake van hergebruik van dieren.
-------------------	--

<b>Naam proef</b>	<b>Worden de dieren gedood?</b>	<b>Doden volgens richtlijn?</b>
3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls	Ja	volgens de richtlijn.

<b>Naam proef</b>		
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>		
Muizen (Mus musculus)	Ongerief: 87,2% Matig 12,8% Licht	

## 5 Samenvatting

### 5.2 lid1

De aanvrager heeft aangegeven dat na het induceren van een ontstekingsreactie bij een deel van de dieren geen pijnbestrijding zal worden toegepast. De aanvrager geeft aan dat pijnbestrijding invloed kan hebben op de te onderzoeken immuunreactie. 5.2 lid1

De DEC baseert haar advies op een meerderheidsstandpunt. Één van de DEC-leden heeft zich onthouden van stemming omdat dit lid zich niet kon vinden in de focus van de aanvraag op neutrofielen zonder de interactie van macrofagen te bekijken. Het DEC-lid geeft ook aan dat de focus van het onderzoek meer zou moeten liggen op de macrofagen, omdat deze als eerste in contact zullen komen met de microplastics in het lichaam. Dit punt is ook geformuleerd als knelpunt voor de DEC. De aanvrager (een expert op het gebied van neutrofielen) beschrijft in het projectvoorstel dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste in aanraking zullen komen met de microplastics in het lichaam. Daarnaast beschrijft de aanvrager ook data te verzamelen over de rol van de macrofagen in de immuunrespons op microplastics. 5.2 lid1

## 6 Voorstel besluit incl. voorstel geldigheidsduur van de vergunning

### 5.2 lid1

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

## 7 Concept beschikking voor akkoord CCD



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

5.1 lid2h  
5.1 lid2e  
5.1 lid2h



**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD 5.1 lid2h 202216420  
**Bijlagen**  
3

Datum 12 mei 2023  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

## CONCEPT

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 23 september 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216420. 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 1 juni 2023 tot en met 31 mei 2028.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### Procedure

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 24 april 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 28 april 2023 en 12 mei 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel en de toegepaste humane eindpunten in de bijlage dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### **Datum:**

12 mei 2023

### **Aanvraagnummer:**

AVD **5.1 lid2h** 02216420

### **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 u dit in een herzien aanvraagformulier heeft aangepast.

### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

12 mei 2023

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2n** 202216420

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 Dierproeven aan

Naam:

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

5.1 lid2h

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2023 tot en met 31 mei 2028, voor het project "Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system" met aanvraagnummer AVD<sup>5.1 lid2h</sup>202216420, na advies van <sup>5.1 lid2h</sup>. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is <sup>5.1 lid2e</sup>. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 23 september 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 12 mei 2023;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls, zoals ontvangen op 12 mei 2023;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 24 april 2023;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 24 april 2023
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 mei 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>			
	Muizen (Mus musculus) / GGO	4.834	87,2% Matig 12,8% 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<sup>5.1 lid2n</sup> 202216420

## 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 202216420

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

**Einde van een dierproef**

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

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

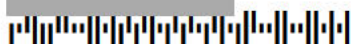
Uit artikel 13c van de wet volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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



> 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 202216420  
**Bijlagen**  
3

Datum 15 mei 2023  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 5.1 lid2e ,

Op 23 september 2022 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216420. 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 1 juni 2023 tot en met 31 mei 2028.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de 5.1 lid2h (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 24 april 2023. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

#### *Nadere vragen aanvrager*

Op 28 april 2023 en 12 mei 2023 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel en de toegepaste humane eindpunten in de bijlage dierproeven. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

### **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 u dit in een herzien aanvraagformulier heeft aangepast.

**Datum:**

15 mei 2023

**Aanvraagnummer:**

AVD 5:1 lid2n 202216420

### **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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

15 mei 2023

**Aanvraagnummer:**AVD **5.1 lid2h** 202216420

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

**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:

5.1 lid2h

Adres:

Postcode en plaats:

Deelnemersnummer:

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2023 tot en met 31 mei 2028, voor het project "Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system" met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216420, na advies van 5.1 lid2h . De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is 5.1 lid2e . Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 23 september 2022
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 12 mei 2023;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls, zoals ontvangen op 12 mei 2023;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 24 april 2023;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 24 april 2023
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 mei 2023.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1 Microplastic exposure versus controls</b>			
	Muizen (Mus musculus) / GGO	4.834	87,2% Matig 12,8% 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<sup>5.1 lid2n</sup> 202216420

## 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 202216420

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

**Einde van een dierproef**

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

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

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

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

**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** dinsdag 16 mei 2023 16:55  
**Aan:** 5.1 lid2h  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD 5.1 lid2h 202216420  
**Categorieën:** Dossier: 5.1 lid2e

Geachte 5.1 lid2h ,

Op 23-09-2022 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Characterizing the interplay between microplastics and the innate immune system' met aanvraagnummer AVD 5.1 lid2h 202216420.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld. De aanvullingen hadden betrekking op de doelcategorieën genoemd in het projectvoorstel en de toegepaste humane eindpunten in de bijlage dierproeven.

De CCD heeft besloten de vergunning toe te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. De beschikking is verstuurd op 16-5-2023.

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. U geeft in het advies op heldere wijze de discussies weer die in de DEC hebben plaatsgevonden.

De aanvrager geeft aan voor een deel van het onderzoek (na toediening van LPS en bacteriën) geen gebruik te maken van verdoving/pijnbestrijding bij een ontstekingsreactie. De CCD had de visie hierop graag teruggezien onder C9 van uw advies.

In uw advies onder E geeft u aan dat het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt en formuleert u een knelpunt dat tijdens de behandeling van dit dossier naar voren is gekomen. Onder deze punten geeft u aan dat een knelpunt is geweest dat de focus van de aanvraag ligt op neutrofielen en niet op de rol van macrofagen. De aanvrager geeft aan dat de hypothese is dat neutrofielen als eerste aanwezig zullen zijn bij de microplastics in het lichaam. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat ook data over macrofagen zal worden verzameld om de rol van macrofagen bij de reactie op microplastics in het lichaam te bestuderen. De CCD heeft kennis genomen van het benoemde knelpunt.

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0800 789 0789  
 E: info@zbo-ccd.nl