

## 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project Van buik naar brein: de rol van darm-bacteriën in autisme en attentie-stoornissen.

1.2 Looptijd van het project 21-4-2016 - 21-4-2021

1.3 Trefwoorden (maximaal 5) microbiom, ASD, ADHD, muis, bacterieel extract

## 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Het doel van dit onderzoek is het effect evalueren van de samenstelling van het microbioom in de darmen (ookwel darmflora genoemd) op gedrag en cognitie. Hiermee willen we in muismodellen nagaan hoe deze relatie kan worden beïnvloed door inname van een bacterieel extract (OM-85). De muizen vertonen de gewenste symptomen die horen bij autisme (ASD), aandachtstekort/ hyperactiviteitsstoornis (ADHD) of een combinatie hiervan. De dieren voeren dezelfde touchscreentaken uit als de menselijke proefpersonen (patiënten en controlegroep) in de geplande klinische studie terwijl ze het bacteriele extract krijgen om hun immuun- en ontstekingsreacties in de darmflora te beïnvloeden.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	We verwachten dat dit de eerste studie zal zijn die onderzoek doet naar de werking van OM-85 op de mechanismen die betrokken zijn bij de menselijke microbioom-brein interactie. De effecten van OM-85 op hersenstructuur, hersenfunctie en gedrag is nog niet eerder bestudeerd. De verwachting is dat we specifieke stoffen zullen vinden, die al in een vroeg stadium laten zien dat iemand lijdt aan de onderzochte aandoeningen. Aan deze vroege detectie is veel behoefte.
3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Voor het dieronderzoek zullen maximaal <b>1140</b> muizen worden gebruikt.
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Neven-effecten van het bacteriële extract zijn tijdens eerdere studies niet waargenomen. Tijdens het uitvoeren van de gedragstaken zullen de muizen in een nieuwe omgeving worden geplaatst. Hier zullen ze moeten wennen aan de touchscreenbox, de behandeling met het extract en de beloning bij de gedragstaak. Dit zal zorgen voor psychische stress van matig niveau, zodat nadelige gevolgen voor de fysieke gezondheid van de dieren niet verwacht wordt. Na afloop van de experimenten zal het leven van de dieren worden beëindigd.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	In het eerste experiment ondergaan alle dieren de behandeling met een placebo, een middelhoge dosis of een hoge dosis van het extract dat direct in de maag zal worden toegediend. Daarnaast zullen ze ook gedragstaken uitvoeren. Door de wijze van toediening van het extract, zal voor 98% van de dieren het niveau van ongerief matig zijn. Door onverwachte stress of ziekte zal voor 2% het ongerief kunnen oplopen tot ernstig. De dieren die in de hieropvolgende autisme- en ADHD- experimenten taken gaan uitvoeren op het touchscreen ondergaan dezelfde behandeling als in de pilot studie. Voor deze dieren geldt daarom ook dezelfde score van ongerief: matig.

- 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? Na afloop van de studie zullen de dieren worden gedood om de invloed van het bacteriële extract op de hersenen te bestuderen.
- 

## 4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. Het doel van dit project is om een beter begrip te krijgen van de complexe processen die verantwoordelijk zijn voor de manifestatie van klinische psychiatrische stoornissen (bijv. ASD en ADHD) bij de mens. Deze processen bevatten de interactie van meerdere factoren van de genetica tot milieu en sociale ervaringen. Deze complexiteit kan alleen realistisch worden gemodelleerd in een intact organisme en niet in celculturen of weefsels. Studies van psychiatrische stoornissen in mensen zijn maar beperkt mogelijk en valide. Dit laatste vanwege heterogene genetische achtergrond, medicatie-effecten en de beperkte beschikbaarheid van post-mortem hersenweefsel van voldoende kwaliteit, met name voor kinderen met ASD en ADHD. De gekozen muismodellen zijn een veelbelovend efficiënt en toegankelijk modelsysteem voor het bestuderen van basisprincipes van de rol van het microbiom op de aandoening en om vragen te beantwoorden die van fundamenteel belang zijn voor zoogdieren.
- 
- 4.2 **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Het gebruik van dieren zal worden beperkt tot het minimum dat nodig is voor het verkrijgen van relevante wetenschappelijk resultaten. Het vereiste aantal dieren is gebaseerd op beschrijvingen van variatie van eerdere vergelijkbare gedragsstudies, een statistische analyse en kennis van onze onderzoeksgroep. Door het combineren van gedragsexperimenten, scans van de hersenen en een analyse van veranderingen in herseneiwitten en het mRNA (een molecuul dat dienst doet om erfelijk materiaal af te lezen en te vertalen in eiwitten) te meten kan er zorgvuldig worden gepland hoe het gebruik van elk dier gemaximaliseerd kan worden. Daarom zullen, waar mogelijk, dezelfde dieren worden gebruikt voor verschillende protocollen en voor alle in de aanvraag voorgestelde metingen.
-

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

Keuze voor de muis als model

Voor het project is het doel om meer te weten te komen over de verschillen in het microbioom in Autisme en ADHD. Om te kunnen onderzoeken hebben we gekozen voor verschillende muismodellen. De gekozen modellen hebben elk een andere oorsprong en etiologie van de stoornissen. Ook vertonen ze verschillende symptomen van Autisme, ADHD of een combinatie hiervan. Muizen hebben volgens onderzoek een redelijk vergelijkbaar fysiologische en anatomische structuur van de darm als de mens. Het darmkanaal in beide bestaat uit anatomische organen die gelijk zijn. Verder is ook de gemiddelde verhouding van de darm en lichaamsoppervlakte gelijk tussen muis en mens (Nguyen, 2015) en is tot nu toe de muis het meest gebruikte diermodel in de studies van het microbiome. Daarom overtreft de kennis van de muis gastro-enterologie, genetica en immunologie elk ander model. Dit maakt de muis de beste keuze in deze studie en zijn de resultaten het beste vertaalbaar naar de mens. Daarnaast beseffen we dat er beperkingen zijn met het gebruik van de geselecteerde muismodellen en zullen de uiteindelijke conclusies met de nodige voorzichtigheid gemaakt worden.

Alleen mannelijke muizen

Aangezien veel van de beschreven ASD en ADHD symptomen specifiek in hogere mate voorkomt bij mannen, worden alleen mannelijke dieren gebruikt in de experimenten. Dit zal leiden tot een beter vertaalbaar resultaat omdat de symptomen aanwezig zijn in de dieren en de mechanismen achter de stoornissen specifiek kunnen zijn per sexe. Bovendien door slechts met de mannelijke muizen te werken minimaliseren we de variatie binnen de groepen en kan het experiment met minder dieren per groep worden uitgevoerd. Met behulp van alleen mannen zal de gender-gerelateerde variaties worden voorkomen worden die tijdens eerdere studies zijn waargenomen in onze eigen en andere laboratoria. Dit houdt in dat we bijvoorbeeld de potentiële estrous-cycle-gerelateerde variabiliteit op de prestaties vermijden bij vrouwelijke dieren en verhoogde mannelijke agressie bij mannelijke dieren wanneer ze in dezelfde apparatuur worden getest als vrouwelijke muizen.

Gekozen muismodellen

De keuze voor de drie muismodellen (VPA, DAT KO en de BALB/cJ) is goed nagedacht. De reden voor het gebruik van de DAT - / - (KO) muis is, dat het gerapporteerd wordt als een "gouden standaard" ADHD model zonder dat er ongemakken zijn voor het fenotype. Veranderingen in de microbioom in dit model zou overtuigen in het onderzoeksveld. Hetzelfde geldt voor het valproaat (VPA) geïnduceerde model (VPA). Dit wordt ook gezien als een 'gouden standaard' model voor de symptomen van ASD op zichzelf. Een derde muismodel is gekozen vanwege dat het BALB/cJ model en hun controle model (BALB/cByJ), modellen zijn die voor zowel ASD als ADHD kan worden gebruikt. Zo modelleren ze veranderingen in sociaal gedrag, impulsiviteit-compulsiviteit en aandacht. Bij de mens zijn de aandoeningen vaak comorbide aanwezig, wat betekent dat deze patiënten zowel ASD en ADHD hebben. Dit gecombineerde fenotype is de basis voor de selectie van BALB/c model dat aspecten van ADHD en ASD eigenschappen vertoont.

Wijze van toediening van het bacteriële extract

Het bacteriële extract zal direct worden toegediend in de maag. Hiervoor is gekozen vanwege negatieve resultaten met het oplossen van het extract in voedsel of water, waarbij de toegediende dosis niet te bepalen was. De manier van toediening in dit project zal echter weinig ongemak veroorzaken, doordat ongerief zal worden geminimaliseerd door professionele uitvoering van de procedure door getraind personeel. Dieren die verwondingen hebben of pijn worden voor het einde van de proef gedood.

4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	Mochten er onverwacht neven-effecten ontstaan bij de behandeling met het bacteriële extract zal niet worden doorgegaan met de experimenten. Ook als er geen veranderingen zijn in het gedrag tijdens te uitgevoerde taken zal er niet worden begonnen met het tweede deel van de experimenten. De dieren worden daarom nauwlettend in de gaten gehouden. Ook als dieren meer gewicht verliezen dan het vooraf opgestelde criterium van 85% van het vrije voedsel gewicht, zal worden bepaald of het dier uit de proef wordt gehaald. Voor het lijden van pijn zal ook vooraf een acceptabel criterium opgesteld worden die tijdens de experimenten geldt. In geval van pijn kan daarbij besloten worden om pijn medicatie te geven ter verlichting of om het dier uit de proef te halen na overleg met de dierverzorger.
-----	---	--

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum	19-05-2016
Beoordelinhteraf	Ja
Andere opmerkingen	De vergunning loopt van 17 mei 2016 tot en met 21 april 2021