

	Inventaris Wob-verzoek W16-19S								
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2016504								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x	x		x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x	x		x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x	x		x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x	x		x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Verzoek aanvulling vergunninghouder				x		x	x	
11	Verzoek aanvulling DEC				x		x	x	
12	Reactie aanvulling vergunninghouder				x	x	x	x	
13	Reactie aanvulling DEC				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x	x	x	x	



14 APR. 2016

Aanvraag
Projectvergunning Dierproeven
Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.nl of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 10500 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen															
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>1 1 7 9 0 3 7</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7									
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																
KvK-nummer	1 1 7 9 0 3 7																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>A. Deusinglaan 1, [Redacted]</td></tr><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>9713AV GRONINGEN</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL80ABNA0446049352</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr></table>	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]	Postbus		Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN	IBAN	NL80ABNA0446049352	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen					
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]																
Postbus																	
Postcode en plaats	9713AV GRONINGEN																
IBAN	NL80ABNA0446049352																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td>☐ Dhr. ☒ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.	Functie	[Redacted]		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	☐ Dhr. ☒ Mw.															
Functie	[Redacted]																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td>☐ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		☐ Dhr. ☐ Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 6 _ 2 0 1 6 |
| Einddatum | 3 1 _ 0 5 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Development of therapeutic strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkelen van therapeutische strategieën voor een remyelinisatie therapie in MS
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|----------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1 |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.584,00 Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

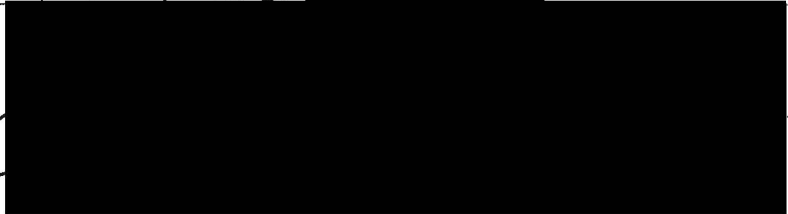
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag
- ☐
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende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

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 12-04-2016 

Handtekening 



Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul de titel van het project in.

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 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Multiple sclerosis: remyelination failure and disease progression

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating disease of the central nervous system (CNS). Clinical symptoms are manifested in a relapsing-remitting or progressive course, leading to an ultimate decline in neurological activity [1]. Current MS therapies focus on immunomodulation, which is effective in relapsing-remitting MS, but not in the progressive stages. The latter would benefit from a neuroprotective approach, including a regenerative therapy. Indeed, remyelination following demyelination is essential for axonal survival and restoration of saltatory conduction, and its failure, despite the presence of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), is a major cause of the neurological deficits in MS [2,3]. Therefore, restoring remyelination in MS should provide an effective treatment in halting disease progression and reversing disability. For the development of such a therapy, elucidation of molecular and cellular mechanisms that contribute to failure or restoration of remyelination are imperative. Therefore, our goal is to identify environmental abnormalities, i.e., extrinsic and intrinsic factors that hamper remyelination or factors that are able to modulate remyelination but are lacking in MS lesions. This will be followed by their selective functional targeting to favour the development of therapeutic strategies for remyelination in MS. Evidently, the development of strategies to promote remyelination might also benefit other demyelinating, dysmyelinating and neurodegenerative diseases.

Previous and further research:

1. Extrinsic factors that contribute to remyelination (failure)

- a) [REDACTED] We and others have [REDACTED]
[REDACTED] More specifically, we [REDACTED]
[REDACTED] We have [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- b) [REDACTED]. Previously, we have
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- c) [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] This finding may explain why [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- d) [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

a) [REDACTED]

- [1] Compston A, Coles A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* 372: 1502-17
- [2] Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. (2009). Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72: 1914-21.
- [3] Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Brück W (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis lesions. *Brain* 131:1749-58.
- [4] Franklin RJ, French-Constant C. (2008). Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci.* 9:839-55.
- [5] [REDACTED]
- [6] Lau LW, Keough MB, Haylock-Jacobs S, Cua R, Döring A, Sloka S, Stirling DP, Rivest S, Yong VW (2012). Chondroitin sulfate proteoglycans in demyelinated lesions impair remyelination. *Ann Neurol.* 72:419-32.
- [7] Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF Jr, Rao MS, Sherman LS (2005). Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11:966-72.
- [8] [REDACTED]
- [9] Simons M, and Trajkovic K (2006). Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci* 119:4381-9.
- [10] [REDACTED]
- [11] [REDACTED]
- [12] Geurts JGJ, Stys PK, Minagar A, Amor S, Zivadinov R. Gray matter pathology in (chronic) MS: Modern views on an early observation. *J Neurol Sci* 2009; 282: 12-20.
- [13] Chang A, Staugaitis SM, Dutta R, Batt CE, Easley KE, Chomyk AM, Yong VW, Fox RJ, Kidd GJ, Trapp BD (2012). Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 72:918-26.
- [14] Viganò F, Möbius W, Götz M, Dimou L (2013). Transplantation reveals regional differences in oligodendrocyte differentiation in the adult brain. *Nat Neurosci.* 6:1370-2.
- [15] Chari DM, Crang AJ, Blakemore WF (2003). Decline in rate of colonization of oligodendrocyte progenitor cell (OPC)-depleted tissue by adult OPCs with age. *J*

Neuropathol Exp Neurol 62:908-16.

[16] [REDACTED]

[17] Selmaj K, Raine AH, and Cross AH (1991). Anti-tumor necrosis factor therapy abrogates autoimmune demyelination. Ann. Neurolog 30:694-700.

[18] Batoulis H, Recks, MS, Holland FO, Thomalla F, Williams RO, Kuerten S (2014). Blockade of TNF-alpha in EAE reveals differential effects on the antigen-specific immune response and central nervous system histopathology. Clin Exp Immunol 175:41-48.

[19] Van Oosten BW, Barkhof F, Truyen L, Boringa JB, Bertelsmann FW, von Blomberg BM, et al. (1996). Increased MRI activity and immune activation in two MS patients treated with the monoclonal anti-TNF antibody cA2. Neurology 47:1531-4

[20] Caminero A, Comabella M, and Montalban X (2011). TNF-alpha, anti-TNF-alpha, and demyelination revisited: an ongoing story. J. Neuroimmunol. 234:1-6.

[21] Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, and Ting JP (2001). TNF-alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. Nat Neurosci 4:1116-22.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?
- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Goal

The quiescence of OPCs is one of the major impediments to remyelination failure in MS [3,4]. During normal CNS development, neurons provide instructive signals for OPC behaviour. Indeed, regulation of OPC behaviour depends on very precise temporal and spatial appearances of an appropriate mix of interacting signalling molecules. In contrast, in a *demyelinated* area signal factors derived from astrocytes and microglia play also a prominent role in the regulation of (re)myelination. [REDACTED]

[REDACTED] Therefore, the main goal of this project is to identify **targets** and subsequently design **tools** to develop strategies for a regenerative therapy for MS.

Feasibility

[REDACTED]

3.3 Belang

Beschrijf het wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang van de hierboven beschreven doelstelling(en).

Multiple sclerosis (MS) is the most common progressive and disabling neurological condition in young adults. It has a prevalence that ranges between 2 and 150

per 100,000, which adds up to approximately 2.5 million people worldwide that are dealing with this debilitating disease. MS is characterized by inflammation, multiple demyelinated lesions, axonal degeneration and reactive glial scar formation. Demyelination is a result of a direct loss of oligodendrocytes, but can also be a consequence of primary axonal degeneration. Remyelination, i.e., when myelin sheaths are restored and functional deficits repaired, is a common feature at early stages of MS (RR-MS), but fails at later stages, resulting in secondary axonal degeneration (SP-MS). Current available therapies rely primarily on immunomodulating- and immunosuppressive strategies, which in essence delay the process of new lesion formation. However, these therapies often fail in patients with progressive MS, indicating that once the cascade of events leading to axonal degeneration has been initiated, suppression of inflammation does not protect clinical disease progression. Thus, the development of treatments that preserve axons by means of remyelination is an essential therapeutic goal. Moreover, since remyelination is crucial for functional neurological recovery and axonal survival, a therapeutic treatment aimed at restoring remyelination is a prerequisite for halting disease progression. Strikingly, in most MS lesions the number of OPCs to produce new myelin suffices, but their differentiation to myelinating oligodendrocytes fails. Therefore, elucidating the underlying mechanism of OPC differentiation failure, and accordingly develop a strategy to overcome OPC differentiation failure, will be a major tool in further exploiting therapeutic potentials in the treatment of MS. In addition, the proposed experiments may provide tools to treat other demyelinating and dysmyelinating disorders and spinal cord injury. Stem cell research will also benefit from this research since it will provide indicators of optimal OPC production in order to enhance remyelination efficiency.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1 Geef een overzicht van de algemene opzet van het project (strategie).

[Redacted content]

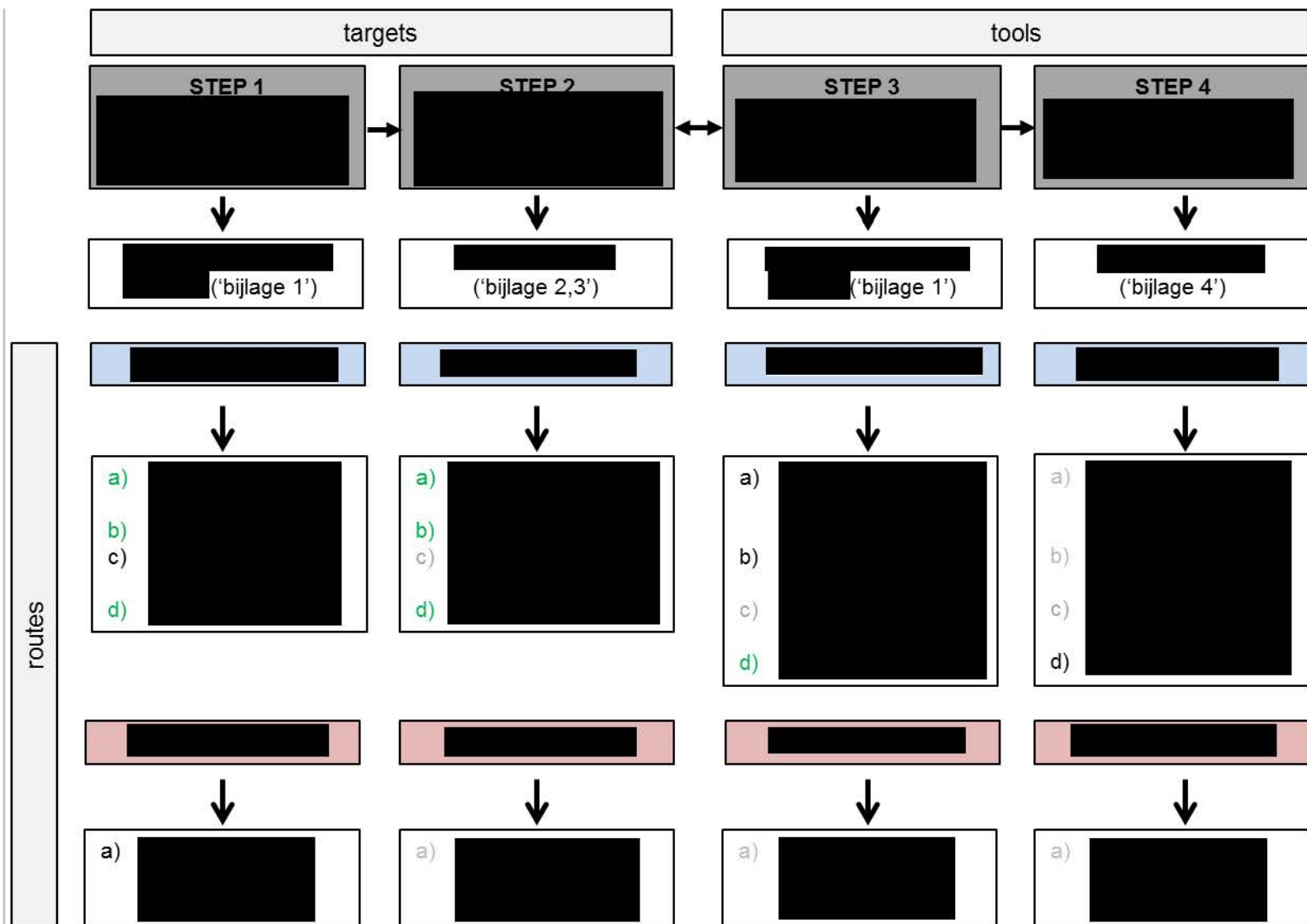


Figure 1:
 (1a-d) (2a) step 1 and 2,
 (steps 3 and 4,
 (1a-d), (1a-d)
 (1c and 2a).

Remyelination is executed by local OPCs. Therefore, our comprehension of the biology of complete remyelination grows from studying OPCs in several models. To start with, OPCs are examined *in vitro* (fig. 1, steps 1, 3), with the major culture systems being a) primary OPCs and oligodendrocytes, b) co-cultures of OPCs with cortical neurons, dorsal root ganglion (DRG) neurons, microglia, macrophages or (grey and white matter) astrocytes, c) embryonic spinal cord myelinating cultures which depend on an astrocyte feeding layer and d) organotypic cerebellar slice cultures. Also, in the latter, demyelination can be induced via addition of lysolecithin to the culture medium and is followed by remyelination over two weeks. Despite their artificial nature, observations from these models are generally in agreement with *in vivo* findings and can be translated to the human setting, and, from a practical perspective, genetic manipulation and addition of experimental factors and factors derived from other primary cell cultures, are relatively feasible. [REDACTED]

[REDACTED] Examination of remyelination *in vivo* is made possible by several rodent toxin-induced animal models. These models induce demyelination by administering toxins harmful to oligodendrocytes, which evokes an endogenous response to achieve robust remyelination over time, usually several weeks. To understand why remyelination fails, findings in these primary cell culture and toxin-induced animal models will be complemented with studies on post-mortem human MS lesions. [REDACTED]

3.4.2 Geef een overzicht op hoofdlijnen van de verschillende onderdelen van het project en de daarbij gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

1a. [REDACTED] (step 3 and 4). An effective strategy to [REDACTED]

1b. [REDACTED] (step 3 and 4): To be able to specifically [REDACTED]

[Redacted text block]

1c. [Redacted] (step 1 and 2):

To unravel [Redacted text block]

[Redacted text block]

2a. [Redacted] (step 1 and 2): To examine whether [Redacted]

[Redacted text block]

3.4.3 Beschrijf en benoem de logische samenhang van deze verschillende onderdelen en de eventuele fasering in de uitvoering. Vermeld eventuele mijlpalen en keuzemomenten.

We aim to [Redacted text block]

[REDACTED]

3.4.4 Benoem de typen dierproeven. Vul per type dierproef een bijlage Beschrijving dierproeven in.

Volgnummer	Type dierproef
1	primary cell culture models
2	cuprizone model
3	transplantation model
4	treatment models
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Primary cell culture models

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Any attempt to enhance remyelination in multiple sclerosis (MS) will require a detailed understanding of the molecular and cellular (signaling) environment and why remyelination fails. Upon identification of targets, tools can be designed and validated to develop strategies for a regenerative therapy for MS.

Remyelination is executed by local processing of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs), and as such an identical process as developmental myelination. Therefore, primary cell cultures models are suitable and valuable to examine effects of cellular and molecular factors on (re)myelination. To identify targets and to develop tools able to promote remyelination in MS lesions, we will make use of the following well-established primary in vitro cell culture models [1-6,

- [REDACTED]
1. Primary OPCs/oligodendrocytes generated from brain [REDACTED] of neonates and adult rats [REDACTED]
[REDACTED]
 2. Primary microglia and astrocytes generated from brain [REDACTED] of neonates (P1-3) in monoculture or in co-culture with OPCs/oligodendrocytes (see 1).
 3. Primary astrocytes generated from brain [REDACTED] of adult rats in monoculture or in co-culture with OPCs/oligodendrocytes (see 1)
 4. Neuronal monocultures from embryonic brains (E15-17, cortical neurons) and spinal cords (dorsal root ganglion (DRG) neurons, E15-17), i.e., when they are still mitotic.
 5. Primary macrophage monocultures generated from neonatal bone marrow (P1-3).
 6. In vitro myelinating cultures. We will apply 2 different in vitro myelinating cultures: i) co-cultures of DRGs (E15-17, see 4)) and OPCs (P1-3, see 1) and ii) embryonic spinal cord cultures (E15-17) which are seeded onto an astrocyte feeding layer.
 7. Organotypic cerebellar slice cultures obtained from neonatal cerebellum. Axons in these cultures will be demyelinated with lyssolecithin and effects on remyelination evaluated.

[REDACTED]

1a. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

1b. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

1c. [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

2a. [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Primary outcome parameters are :

- [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

References:

- [1] [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
- [3] [REDACTED]
[REDACTED]
- [4] [REDACTED]
[REDACTED]
- [5] [REDACTED]
[REDACTED]
- [6] [REDACTED]
[REDACTED]

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

We will perform in vitro experiments on primary cell cultures isolated from cells, i.e., after the animals have been sacrificed. Neonates (P1-3, 1-week-old) will be decapitated, adult rats (pregnant, 9-months and 21 months old) will receive an overdosis of nembutal via IC injection when under anaesthesia (isoflurane). The embryos (E15-17) will die from the nembutal injection of the mother. IC injection is not essential but results in a quicker response compared to IP injection.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

We will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPC, oligodendrocyte, microglia, astrocyte, and macrophage cultures from the same neonate (P1-3, [REDACTED]) using a shake-off method. From the same animal, we will also obtain organotypic cerebellar slice cultures. To isolate and culture neurons E15-17 embryo's, i.e., when neurons are still postmitotic, are necessary. In addition, from one litter we will combine, whenever possible, experiments. [REDACTED]
[REDACTED]

Experimental techniques to be used on the primary cell culture models: RNA-Seq, Western blotting, proteomics, ELISA, immunocytochemistry, immunoprecipitation, thin layer chromatography, qPCR, RNAi, and different functional (cell behavior, activity) assays. Especially the RNA-Seq studies, TLC and biochemical assays (Western blotting, proteomics and co-immunoprecipitation) require high cell numbers.

Prior to the experiments with the primary cell culture models, we will perform a power analysis to calculate the minimum number of independent experiments that are required to obtain sufficient statistical power to detect differences. Usually, dependent on the experimental set up, 3-5 independent experiments are required ([REDACTED]). Based on the power analysis, we will make a calculation of how many animals that are needed for the experiments based on how many cells we approx. generate from one animal and how many cells we need for a particular experiment and technique. Of note, we have on average a yield of (i) 1 million OPCs/oligodendrocytes, 400,000 microglia, 600,000 bone marrow macrophages, and 2 million astrocytes per P1-3 neonate, (ii) 200,000 cortical neurons and 250,000 DRGs per E15-17 embryo, (iii) 6 million astrocytes per adult brain (cortical vs non-cortical 1:2) and (iv) 100.000 OPCs from the cortex, and 50.000 from the corpus callosum.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

Wistar rats, purchased from a recognized supplier in Europe.

Total estimated numbers:

1. 20 pregnant rats (200 E15-17 embryo's)
2. 200 pregnant rats (2000 P1-3 neonates)
3. 60 pregnant rats (600 1 week-old neonates)
4. 100 9 months-old rats
5. 100 20 months-old rats

These estimated numbers are based on the number of animals that were required for similar kind of experiments with these primary cell culture models we performed in the last couple of years, the amount of cells required per experimental set up, the number of cells generated per animal, and 10 neonates (embryos) per litter.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

The project examines primary cells culture models of brain resident cells (astrocytes, OPCs, oligodendrocytes, DRG and cortical neurons, total spinal cord cultures, microglia) from different regions, and therefore requires the use of brain tissue from embryonic, new-born and adults rats to acquire monocultures, co-cultures (myelinating, astrocyte-OPC) and organotypic cerebellar slice cultures. Whilst it might be possible to perform some of these experiments in cell lines, such an approach would have significant disadvantages. The cell lines available represent very poor models for the questions being addressed here, i.e., oligodendrocyte cell lines do not terminal differentiate and proper myelin membrane formation is very limited, if at all present. In addition, cell lines do not

face regional cues and the effect of (local) aging. Also, such a controlled study is not possible with post-mortem human material, as obtaining pure OPCs from human origin will be technically challenging, if possible at all. Importantly, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents are the lowest relevant species we can use to study (re)myelination. All the experiments will be performed with rat-derived cells, which have been characterised extensively for remyelination research by several groups including our own, and therefore most appropriate to further expand knowledge on existing data.

Reduction

We will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPC, oligodendrocyte, microglia, astrocyte, and bone-marrow derived macrophage cultures from the same neonate (P1-3, [REDACTED]). From the same animal, we will also obtain organotypic cerebellar slice cultures. To isolate and culture neurons E15-17 embryo's, i.e., when neurons are still postmitotic, are necessary. In addition, from one litter we will combine, whenever possible, experiments as well as the brain of the mother to isolate and culture adult [REDACTED] astrocytes. [REDACTED]

Refinement

In order to obtain newborn or embryonic animals we will purchase timed-pregnant females, each of which will be single housed and kept for up to one week before the embryo's or newborns are used. Two days before the due date, the pregnant animal will be monitored twice a day. If the pregnant rat will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

The pregnant rats will be single housed.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.a. (fundamental research)

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Pregnant animals can become uncomfortable and stressed when giving birth.
2. Pups can die from being trampled when the mothers are housed with other animals.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Several (pregnant) animals in one cage.
2. Overcrowded cages.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1+2. Pregnant animals will be single housed.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

If the pregnant rat will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Animals will have minimal pain since they will die before we perform our (in vitro) experiments from an overdose of nembutal under isoflurane anesthesia (adult (pregnant) rats and embryo's) or fast decapitation (neonates). For neuronal cultures, pregnant rats will be sacrificed with an overdose of nembutal (IC injection upon isoflurane anaesthesia), after which the embryo's will be removed. The embryo's will die in the uterus of the nembutal.

Given that the animals will be sacrificed without previous action, the total discomfort is classified as 'lichtl'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

The animals have to be sacrificed to perform the in vitro experiments on isolated cells.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☒ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Newborn rats (P1-3, 1 week) will be decapitated. Given the age of the animals this will give less discomfort.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Cuprizone model

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Any attempt to enhance remyelination in multiple sclerosis (MS) will require a detailed understanding of the molecular and cellular (signalling) environment and why remyelination fails. Upon identification of targets, tools can be designed and validated to develop strategies for a regenerative therapy for MS.

Examination of remyelination in vivo is made possible by several rodent toxin-induced animal models. In these models demyelination is induced by administering toxins harmful to oligodendrocytes, which evokes an endogenous response to achieve remyelination over time, usually several weeks. An example is the dietary cuprizone model. Feeding cuprizone results in demyelination of distinct brain regions, mostly studied in the corpus callosum (white

matter area) and cortex (grey matter area), with remarkable preservation of the axons. Given its reproducibility and that demyelination is followed by robust remyelination in both grey and white matter, the acute cuprizone model is chosen to validate and analyse the expression and cellular localisation of potential targets and tools during de- and remyelination. The targets have been identified in primary cell culture models and/or MS lesions, and are involved in remyelination per se or remyelination failure.

The cuprizone model is best characterized in the C57BL/6 mice strain, while rats are resistant to cuprizone-induced demyelination and therefore do not represent a suitable model to study remyelination events [1,2]. Female mice are more resistant to cuprizone-induced demyelination, which will result in variable degrees of demyelination [3,4]. We will therefore only use male C57BL/6 mice for the validation (expression and localisation) of potential disease-specific targets in de- and remyelination.

Feeding cuprizone has been shown to induce selective oligodendrocyte cell death between 10-21 days, followed by demyelination which is maximal after 5 weeks [1,3]. After 5 weeks, mice will return to a normal diet resulting in remyelination by endogenous OPCs with almost complete remyelination 2 weeks after removal of cuprizone from the chow [1,3]. To elucidate the (timely) presence of a potential target or tool during de- and/or remyelination, we will sacrifice the animals upon 3 weeks ('early demyelination') and 5 weeks ('late demyelination') of cuprizone feeding, as well as upon 5 weeks cuprizone feeding, followed by 2 weeks normal feeding ('remyelination'). Demyelination and remyelination will be verified with myelin stains (LFB, Sudan black) and in situ hybridisation of the major myelin protein PLP.

Primary outcome parameters are:

- the expression and localisation of the mRNA of the factor of interest (in situ hybridisation and qPCR) in the corpus callosum and/or cortex
- the expression and localisation of the protein of the factor of interest (Western blot, immunohistochemistry) in the corpus callosum and/or cortex.

[REDACTED]

References:

- [1]. Gudi V, Ginge S, Skripuletz T, Stangel M (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci* 8:73
- [2] Love S (1988). Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphological observations. *J Neurol Sci* 84:223-37.
- [3] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009). The cuprizone animal model: new insights into and old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-36.
- [4] Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*:19:467-479.

[5] [REDACTED]

[REDACTED]

[6] [REDACTED]

[REDACTED]

[7] [REDACTED]

[REDACTED]

[8]

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Male C57BL/6 mice (age 8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone powder diet for 5 weeks. After 5 weeks the mice will return to the standard food for 2 weeks. Introduction of the cuprizone powder diet will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual weight gain during the next weeks. Therefore, the first week of cuprizone diet will require daily weight measurement. Later on this can be reduced to once every 3 days. The weighing will also be conducted prior to the cuprizone diet to establish a base line. The (daily) behavioural monitoring will be focused on recognizing key signals indicating animal discomfort, i.e., excess weight loss, biting, curved back, concave abdomen, dehydration and deficient reflexes. Despite demyelination in the CNS, the animals do not face major behavioural deficits, likely because the direct damage to axons is minimal.

We will sacrifice animals at the indicated time points to be able to follow and localize the mRNA (in situ hybridisation and qPCR) and protein expression (Western blot, immunohistochemistry) of the factor of interest in the corpus callosum and cortex. For immunohistochemistry, the animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative. The chest cavity will be opened and a perfusion needle will be placed in the left ventricle. Physiological salt followed by the appropriate fixative will be pumped through the vascular system after cutting the liver. For immunohistochemistry on fresh frozen tissue, biochemical and qPCR analysis, the animals will be anesthetized (isoflurane) and sacrificed with an overdose of nembutal (IC injection), after which the cortex and corpus callosum will be collected and/or analyzed. IC injection is not essential but results in a quicker response compared to IP injection.

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

To obtain insight in the expression and localisation of the factor of interest over time upon demyelination and remyelination, 3 time points (early and late demyelination: 3 weeks and 5 weeks cuprizone, remyelination 2 weeks after 5 weeks cuprizone) and control mice are required. For a throughout analysis of the factors, expression profiles at the RNA (qPCR) and protein level (Western blotting) are essential, as well as details on their cellular localisation (in situ hybridisation and immunohistochemistry). These methods require different processing of the tissue, and can therefore not be combined. It is anticipated that sufficient material will be obtained to analyse several factors. However, dependent on the number of factors identified, it can be not excluded that (part of) the experiment has to be performed twice.

To determine the minimum number of animals that is required in this study in order to have sufficient statistical power to detect differences in the expression of the factor of interest at the indicated time points, a power analysis will be performed. Since demyelination and remyelination are very reproducible in the cuprizone model, particularly when applied in male mice, and based on previous research experience with the cuprizone model, we anticipate that 4-5 animals per experimental group will be sufficient to obtain statistical differences.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

male C57BL/6 mice, 8-12 weeks of age, purchased from a recognized supplier in Europe

total estimated number: 160

calculation: 2x (4 groups x 4 analysis methods x 5 animals per analysis method)= 160

4 groups (control, early (3 weeks) and late demyelination (5 weeks), remyelination) will be studied. The total estimated number per group is estimated on 20 (4x5). This is based on 4 different methods of analysis, which can not be performed on the same animal since the methods require different processing of the tissue, and 5 animals per analysis method. There is a chance - dependent on the number of targets and tools to be examined- that the amount of acquired material does not suffice, and that (part of) the experiment has to be performed twice (2x).

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

Experimental findings ('disease target and tools') obtained with primary cell cultures models need to be validated in a more complex, but controlled, in vivo situation, i.e., upon demyelination and remyelination. Such a controlled study is not possible with post-mortem human material. Furthermore, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents are the lowest relevant species we can use to study (re)myelination.

Reduction

The cuprizone model is highly reproducible particularly in male mice, and therefore a minimal number of animals will be required to have sufficient statistical power. With the current experimental set up grey and white matter areas can be analysed in the same animal. Sufficient material will be obtained to analyse multiple factors (disease targets and tools).

Refinement

In contrast to other toxin-induced demyelination animal models, the dietary cuprizone model leads to only limited discomfort (preservation of axons). ■■■■

■■■■ Key signs for animal discomfort (weight loss, piloerection, crooked back, dehydration, reduced reflexes) will immediately be followed by termination. The animals will be single housed.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te

beperken.

The animals will be single housed.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.a. (fundamental research)

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

☐ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☐ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Only male mice in one cage may lead to stress and they may kill each other.
2. There is a small change (<1%) that the cuprizone diet may result in paralysis symptoms.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. At this age there is risk that male mice become territorial.
2. Unforeseen damage to the demyelinated axons.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1. All male animals will be single housed.
2. Daily behavioural monitoring.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

1. weight lost >15%
2. paralysis symptoms

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The animal discomfort of the cuprizone diet for 5 weeks is mild. Introduction of the cuprizone-containing powdered chow will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual recovery during the next weeks. In previous experiments no adverse effects on behaviour were observed.

Therefore, the total discomfort is classified as 'licht'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Processing of tissue is required to answer the research questions.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Transplantation model

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

[REDACTED]

To induce demyelination, we will make use of an established cuprizone-induced chronic demyelination model [1-4]. Feeding cuprizone for 12 weeks has been shown to induce selective oligodendrocyte death in grey and white matter areas, resulting in chronic demyelinated grey and white matter areas and reduced OPC numbers [1-4]. The chronic cuprizone model is preferred over the acute demyelination model (5 weeks cuprizone diet), since in the acute model remyelination by transplanted OPCs will proceed in a background of efficient remyelination by endogenous OPCs. Prolonged cuprizone exposure induces chronic demyelination and impairs the capacity of the brain to repair; endogenous OPCs are almost depleted, while direct damage to axons is minimal [2-4].

The cuprizone model is best characterized in the C57BL/6 mice strain, while rats are resistant to cuprizone-induced demyelination and therefore do not represent a suitable model to study remyelination events [2,5]. Female mice are more resistant to cuprizone-induced demyelination, which will result in variable degrees of demyelination [3, 6]. We will therefore only use male receiver C57BL/6 mice for the transplantation studies.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Primary outcome parameters are:

- demyelination and remyelination using myelin stains (LFB, sudan black) and in situ hybridisation of the major myelin protein PLP.
- proliferation (Ki67/Olig2 double labeling), differentiation (staining with stage-specific and lineage specific markers, including Olig2, Nkx2.2 for OPCs and CC1 for mature oligodendrocytes) and remyelination potential (electron microscopy (EM), g-ratio) of the transplanted OPCs.

All experimental procedures are running in the lab [REDACTED]

References:

- [1]. Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman J E, Matsushima GK (2004). Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol* 164: 1673–82.
- [2]. Gudi V, Gingele S, Skripuletz T, Stangel M (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci* 8:73
- [3] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009). The cuprizone animal model: new insights into and old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-36.
- [4] Skripuletz T, Lindner M, Kotsiari A, Garde N, Fokuhl J, Linsmeier F, Trebst C, Stangel M (2008). Cortical demyelination is prominent in the murine cuprizone model and is strain-dependent. *Am J Pathol* 172:1053-61.
- [5] Love S (1988). Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphological observations. *J Neurol Sci* 84:223-37.

[6] Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. Brain Pathol:19:467–479.

[7] [REDACTED]

[8] [REDACTED]

[9] [REDACTED]

[10] [REDACTED]

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Male C57BL/6 mice (age 8-12 weeks, 'receivers') will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone powder diet for 12 weeks. Introduction of the cuprizone powder diet will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual weight gain during the next weeks. Therefore, the first week of cuprizone diet will require daily weight measurement. Later on this can be reduced to once every 3 days. The weighing will also be conducted prior to the cuprizone diet to establish a base line. The (daily) behavioural monitoring will be focused on recognizing key signals indicating animal discomfort, i.e., excess weight loss, biting, curved back, concave abdomen, dehydration and deficient reflexes. Despite demyelination in the CNS, the animals do not face major behavioural deficits, likely because the direct damage to axons is minimal.

[REDACTED]

After stereotatic injection of donor OPCs, all mice will return to a normal diet to allow assessment of the effect of the different transplanted OPCs on remyelination. To follow remyelination by the transplanted OPCs over time, we will sacrifice animals at 3 and 14 days post transplantation. To assess remyelination we will perform immunohistochemical (IHC) and EM analysis (see primary outcome parameters). The animals will be anesthetized with isoflurane. The chest cavity will be opened and a perfusion needle will be placed in the left ventricle. Physiological salt followed by the appropriate fixative for IHC or EM analysis will be pumped through the vascular system after cutting the liver.

[REDACTED]

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

To determine the optimal number of cells to be injected and to determine whether the transplanted cells can be traced in a demyelinated area, we will first

perform a pilot experiment with 3 different concentrations of [REDACTED] of 1 week-old neonates ('cell numbers') transplanted in a demyelinated [REDACTED] area ([REDACTED]) of cuprizone-fed receiver mice.

When the optimal number of cells to be injected is determined we will perform the experiment as described above. Animals [REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

The experiments will be performed [REDACTED]

[REDACTED]

To determine the minimum number of animals that is required in this study in order to have sufficient statistical power to detect differences in OPC maturation upon transplantation, a power analysis will be performed. Since demyelination and remyelination are very reproducible in the cuprizone model, particular when applied in male mice, and based on previous research experience with the cuprizone model [REDACTED], we anticipate that 4-5 animals per experimental group will be sufficient to obtain statistical differences.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

C57BL/6 mice, purchased from a recognized supplier in Europe.

[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]

Estimated number per experiment:

1. pilot experiment

receivers: max. 2 experiments; per experiment 4 different amounts of donor OPCs x 3 animals per group = $2 \times (4 \times 3) = 24$ receivers
donors 2 experiments = 2 pregnant mice (8 neonates per litter)

4 different amounts of donor [REDACTED] OPCs (0 (saline injection), 1000, 10000 and 50000 obtained from 1 week-old neonates) will be injected in the demyelinated corpus callosum of 12-weeks cuprizone fed mice ('receivers'). The transplanted OPCs will be traced and their differentiation analyzed at 14 days post transplantation (immunohistochemistry). In this pilot experiment 3 animals per group will be analyzed. There is a chance that the donor OPCs can not be traced, and that either the number of injected is insufficient or a different tracer maybe required. This will require a second pilot experiment.

2. [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

[REDACTED], and therefore requires the use of brain tissue from new-born and adult mice. Such a study is not possible with post-mortem human material. Also cell lines (as donor cells) represent a very poor model for the questions being addressed here, as such cells do not face regional cues and the effect of (local) aging, and their remyelination potential is limited. [REDACTED]

[REDACTED]
regional demyelination. Furthermore, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Only male mice (receivers) in one cage may lead to stress and they may kill each other.
2. There is a small change (<1%) that the cuprizone diet may result in paralysis symptoms.
3. Pregnant animals can become uncomfortable and stressed when giving birth.
4. Pups can die from being trampled when the mothers are housed with other animals.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. At this age there is risk that male mice become territorial.
2. Unforeseen damage to the demyelinated axons.
3. Several (pregnant) animals in one cage
4. Overcrowded cages.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1. All male animals will be single housed.
2. Daily behavioural monitoring.

3+4. Pregnant animals will be single housed.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

1. weight lost >15%

2. paralysis symptoms

3. If the pregnant mouse will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The animal discomfort of the cuprizone diet for 12 weeks is mild. Introduction of the cuprizone-containing powdered chow will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual recovery during the next weeks. In previous experiments no adverse effects on behaviour were observed. The stereotactic injection of donor OPCs is classified as 'matig'. Previous experiments with stereotactic injections indicate that weight loss (~10%) can be expected during the first days, which is followed by rapid recovery. Given the injection of non-modulated OPCs at a local area no additional symptoms of the model are expected. [REDACTED] donor mice will have minimal pain since they will die before we isolate the OPCs (and without previous action, 'licht').

Therefore, the total discomfort is classified as 'matig'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Processing of tissue is required to answer the research question.

The animals have to be sacrificed to isolate donor cells for transplantation.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☒ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

1 week-old neonates will be decapitated. Given the age of the animals this will give less discomfort.

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

- Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
- Meer informatie vindt u op de website www.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		4	Treatment models

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Novel developed strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis (MS), i.e., tools that promote remyelination and/or overcome remyelination failure, need to be validated in an animal model prior to the 'first in human' studies.

To validate agents ('tools') that modulate remyelination, toxin-induced demyelination models are used. An example is the dietary cuprizone model. Feeding cuprizone causes reproducible demyelination in the corpus callosum and cortex with remarkable preservations of the axons, followed by robust remyelination upon cuprizone removal via a predictable time course. Thus, cuprizone induces selective oligodendrocyte cell death between 10-21 days, followed by

demyelination which is maximal after 5 weeks [1,2]. After 5 weeks, mice will return to a normal diet resulting in remyelination by endogenous OPCs with almost complete remyelination 2 weeks after removal of cuprizone from the chow [1,2]. Given that the cuprizone model captures several aspects of MS pathology, including neuroinflammation by resident microglia cells, its reproducibility, and sufficient time span of remyelination, the acute cuprizone model is chosen to validate agents that modulate remyelination.

The cuprizone model is best characterized in the C57BL/6 mice strain, while rats are resistant to cuprizone-induced demyelination and therefore do not represent a suitable model to study modulation of remyelination (failure) [1,3]. Female mice are more resistant to cuprizone-induced demyelination induced by cuprizone, which will result in variable degrees of demyelination [2,4]. We will therefore only use male mice.

In toxin-induced demyelination models, lesions are created with robust endogenous remyelination capacity. Potential effects of agents that modulate remyelination can be validated by assessing their effect on the speed and extent of remyelination. However, cuprizone-induced demyelinated areas do not properly mimic remyelination-inhibiting features of the MS lesion environment. Thus, to validate targets that overcome remyelination failure, a local MS lesion environment needs to be created first. In addition, when the tools are directed against a human receptor, humanized animals are required. Therefore, dependent on the strategy and target (modulation of remyelination per se or overcoming remyelination failure) and tools (e.g. human receptor agonists), the following three different treatment models will be applied.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block]

Primary outcome parameters are:

[Redacted text block]

Primary outcome parameters are:

[Redacted text block]

References:

- [1]. Gudi V, Ginge S, Skripuletz T, Stangel M (2014). Glial response during cuprizone-induced de- and remyelination in the CNS: lessons learned. *Front Cell Neurosci* 8:73
- [2] Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009). The cuprizone animal model: new insights into and old story. *Acta Neuropathol* 118: 723-36.
- [3] Love S (1988). Cuprizone neurotoxicity in the rat: morphological observations. *J Neurol Sci* 84:223-37.
- [4] Taylor LC, Gilmore W, Matsushima GK (2009). SJL mice exposed to cuprizone intoxication reveal strain and gender pattern differences in demyelination. *Brain Pathol*:19:467-479.

[5] [REDACTED]

[6] [REDACTED]

[7] [REDACTED]

[8] [REDACTED]

[9] [REDACTED]

[10] [REDACTED]

[11] [REDACTED]

[REDACTED]

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

Treatment model 1: to overcome remyelination failure in an MS lesion environment

Male C57BL/6 mice (age 8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone powder diet for 5 weeks. Introduction of the cuprizone powder diet will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual weight gain during the next weeks. Therefore, the first week of cuprizone diet will require daily weight measurement. Later on this can be reduced to once every 3 days. The weighing will also be conducted prior to the cuprizone diet to establish a base line. The (daily) behavioural monitoring will be focused on recognizing key signals indicating animal discomfort, i.e., excess weight loss, biting, curved back, concave abdomen, dehydration and deficient reflexes. Despite demyelination in the CNS, the animals do not face major behavioural deficits, likely because the direct damage to axons is minimal.

[REDACTED]. The total volume (3 µL) will be injected over a period of 60 seconds followed by a 'diffusion' period of 2 minutes before needle extraction. During surgery (~15 minutes) the animals will be warmed, eye salve will be used and the wound will be kept moist with saline. After the stereotatic injection, mice will return to a normal diet. 1 day after [REDACTED] injection, animals will be treated with BBB passing protease-containing nanoparticles, which will be given either

orally or via IV injection. [REDACTED]

At the indicated time points the animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative. The chest cavity will be opened and a perfusion needle will be placed in the left ventricle. Physiological salt followed by the appropriate fixative will be pumped through the vascular system after cutting the liver. For fresh frozen tissue, the animals will be anesthetized (isoflurane) and sacrificed with an overdose of nembutal (IC injection). IC injection is not essential but results in a quicker response compared to IP injection.

Treatment model 2: to modulate (endogenous) remyelination

Mice (8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone diet for 5 weeks as described for treatment model 1. After 5 weeks cuprizone feeding, [REDACTED] or vehicle control will be introduced by stereotactic injection in the ventricles (under isoflurane anaesthesia), according to the same procedure as described for treatment model 1. After the stereotactic injection, mice will return to a normal diet. The effect on OPC differentiation and remyelination will be assessed 7 and 14 days injection by immunohistochemistry and EM. The animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative for each method (see for procedure treatment model 1).

Treatment model [REDACTED]

Cuprizone model

Mice (8-12 weeks) will be subjected to a 0.2% (w/w) cuprizone diet for 5 weeks as described for treatment model 1. After 5 weeks cuprizone feeding, [REDACTED] will be introduced by stereotactic injection in the ventricles (under isoflurane anaesthesia), according to the same procedure as described for treatment model 1. After the stereotactic injection, mice will return to a normal diet. The effect on OPC differentiation, remyelination and microglia activation will be assessed 7 and 14 days injection by PET imaging (longitudinal on 14-days group), immunohistochemistry, and EM. Remyelination will be further verified with myelin stains (LFB, sudan black) and in situ hybridisation of the major myelin protein PLP. [REDACTED]

[REDACTED] At the indicated time points the animals will be anesthetized with isoflurane followed by perfusion with the appropriate fixative for each method (see for procedure treatment model 1).

Geef aan welke overwegingen en statistische methoden worden gebruikt om het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken.

The validation of the different strategies/tools, i.e., to modulate remyelination per se (extent and/or speed), to the overcome remyelination failure, or the

effect of agents specific for humans, require different treatment models. To assess the ability of the 'treatments' on remyelination, analysis at 2 different time points will be required, i.e., at an early and late stage in the remyelination process. In addition to assess the extent of OPC differentiation, microglia activation and remyelination, both immunohistochemical and EM analysis are required. These methods require different processing of the tissue, and can therefore not be combined. Myelin stains and in situ hybridisation can be performed on the same tissue as used for immunohistochemistry.

To determine the minimum number of animals that are required in this study in order to have sufficient statistical power to detect differences of the agents on remyelination, a power analysis will be performed. Since demyelination is very reproducible in the cuprizone model, particularly when applied in male mice, and based on previous research experience with the cuprizone model [REDACTED], we anticipate that 4-5 animals per experimental group will be sufficient to obtain statistical differences.

For the primary cell cultures (treatment model 3), we will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPC, oligodendrocyte and microglia cultures from the same neonate (P1-3). Prior to the experiments with the primary cell culture models, we will perform a power analysis to calculate the minimum number of independent experiments that are required to obtain sufficient statistical power to detect differences. Usually, dependent on the experimental set up, 3-5 independent experiments are required. Based on the power analysis, we will make a calculation of how many animals that are needed for the experiment based on how many cells we approx. generate from one animal and how many cells we need for a particular experiment and technique. Of note, we have on average a yield of 800,000 OPCs/oligodendrocytes and 300,000 microglia per P1-3 neonate, and 8 neonates per litter.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levenstadia. Onderbouw deze keuzes.

1. C57BL/6 mice: male 8-12 weeks of age, purchased from a recognized supplier in Europe: estimated number 120

[REDACTED]
[REDACTED]

Estimated number per treatment model:

Treatment model 1: to overcome remyelination failure in an MS lesion environment

calculation: 3 groups x 2 time points x 2 analysis methods x 5 animals per group = 60 C57BL/6 mice

3 groups ([REDACTED] and vehicle control) will be studied, at 2 different time points and with 2 different methods of analysis (IHC, DOC extraction), which can not be performed on the same animals since the methods require different processing of the tissue. Per method 5 animals per group are required.

Treatment model 2: to modulate (endogenous) remyelination

calculation: 3 groups x 2 time points x 2 analysis methods x 5 animals per group = 60 C57BL/6 mice

3 groups (antagonist 1, antagonist 2, and vehicle control) will be studied at 2 different time points and with 2 different methods of analysis (IHC, EM), which

can not be performed on the same animal since the methods require different processing of tissue. Per method 5 animal per group are required.

Treatment model [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

Is er in het voorgaande of in het geplande gebruik sprake van (of een risico van) ernstig ongerief?

☒ Nee

☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

D. Vervanging, vermindering en verfijning

Laat zien hoe de toepassing van methoden voor vervanging, vermindering en verfijning zijn meegewogen bij het bepalen van de experimentele strategie, de keuze van de dieren en de opzet van de dierproef en welke keuzes daarbij zijn gemaakt.

Replacement

Experimental strategies ('tools') that modulate remyelination or overcome remyelination failure and which are developed in primary cell cultures models, need to be validated in a more complex, but controlled, in vivo situation, i.e., upon demyelination and remyelination. Such a study is not possible with post-

mortem human material. Furthermore, in order to properly extrapolate the findings to humans, animal species with myelinated axons are required and rodents are the lowest relevant species we can use to study (re)myelination. Whilst it might be possible to perform some of these experiments in cell lines (treatment model 3, primary cell cultures), such an approach would have significant disadvantages. The cell lines available represent very poor models for the questions being addressed here, i.e., oligodendrocyte cell lines do not terminal differentiate and proper myelin membrane formation is very limited, if at all present.

Reduction

The dietary cuprizone model is highly reproducible and therefore a minimal number of animals will be required to have sufficient statistical power. For the primary cell cultures we will use an isolation procedure which enables us to obtain purified OPCs, oligodendrocytes and microglia from the same neonate (P1-3). [REDACTED]

Refinement

In contrast to other toxin-induced demyelination animal models, the dietary cuprizone model leads to only limited discomfort (preservation of axons). [REDACTED] Prior to the stereotactical injection the mice will be anesthetized and local analgesia at the periost will be provided (lidocaine hydrochloride-monohydrate). Immediately following the implantation the mice will receive systemic analgesia (carprofen s.c). This procedure will be repeated after 24 hours. [REDACTED] Key signs for animal discomfort (weight loss, piloerection, crooked back, dehydration, reduced reflexes) will immediately be followed by termination. The animals will be single housed. Pregnant females will be single housed up to one week before newborns are used. Two days before the due date, the pregnant animal will be monitored twice a day. If the pregnant animal will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

Geef aan welke maatregelen zijn genomen om de kans op pijn, lijden of angst bij de dieren en de kans op nadelige milieueffecten tot een minimum te beperken.

Prior to the stereotactical interlesional injection the mice will be anesthetized and local analgesia at the periost will be provided (lidocaine hydrochloride-monohydrate). Immediately following the injection the mice will receive systemic analgesia (carprofen s.c). this procedure will be repeated after 24 hours. Key signs for animal discomfort (weight loss, piloerection, crooked back, dehydration, reduced reflexes) will immediately be followed by termination. The animals will be single housed.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

Geef aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.

n.a. (fundamental research)

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

Worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest en/of verzorgd?

☒ Nee

☐ Ja > Geef, indien dit kan resulteren in nadelige effecten op het dierenwelzijn, aan op welke wijze de dieren worden gehuisvest en verzorgd en motiveer de keuze om af te wijken van de eisen in bovengenoemde bijlage III.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.

Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

☒ Ja

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Only male mice in one cage may lead to stress and they may kill each other.
2. There is a small change (<1%) that the cuprizone diet may result in paralysis symptoms.
3. Pregnant animals can become uncomfortable and stressed when giving birth.
4. Pups can die from being trampled when the mothers are housed with other animals.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. At this age there is risk that male mice become territorial.
2. Unforeseen damage to the demyelinated axons.
3. Several (pregnant) animals in one cage

4. Overcrowded cages.

Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.

1. All male animals will be single housed.
2. Daily behavioural monitoring.
- 3+4. Pregnant animals will be single housed.

J. Humane eindpunten

Valt te voorzien dat zich bij deze dierproef omstandigheden voordoen waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen?

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

1. weight loss >15%,
2. paralysis symptoms or
3. alteration of their behaviour after stereotactic injection.
4. If the pregnant mice will notably suffer when she is giving birth, we will sacrifice the animal.

Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?

<1%

K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

The animal discomfort of the cuprizone diet is mild. Introduction of the cuprizone-containing powdered chow will be accompanied with mild weight loss during the first week, which will be followed by a gradual recovery during the next weeks. Previous experiments with stereotactic injections indicates that weight loss (~10%) can be expected during the first days, followed by rapid recovery. No other adverse effects on behaviour were observed. The longitudinal double PET-scan procedure may lead to discomfort. Taken into account the 1 week recovery time between scans, and that they are again on normal chow in this phase of the experiment, we estimate that the total discomfort for these animals is 'matig'. Neonates (P1-3) will have minimal pain since they will die before we isolate the OPCs and microglia of fast decapitation (and without previous action, 'licht').

Therefore, the total level of discomfort for all three treatment models is 'matig'.

Einde experiment

L. Wijze van doden

Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?

☐ Nee > Ga verder met de ondertekening.

☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Processing of tissue is required to answer the research question.

The animals have to be sacrificed to perform the in vitro experiments on isolated cells.

Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?

☒ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Newborn mice (P1-3) will be decapitated. Given the age of the animals this will give less discomfort.

☒ Ja

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project: **Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis**
3. Titel van de NTS: **Ontwikkelen van therapeutische strategieën voor een remyelinisatie therapie voor multiple sclerose**
4. Type aanvraag:
 - ☐ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC: **03-12-2015**
 - ☐ aanvraag compleet: **03-12-2015**
 - ☐ in vergadering besproken: **10-12-2015**
 - ☐ anderszins behandeld: **10-03-2016, 25-03-2016**
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot: **11-12-2015 tot 01-03-2016, 10-03-2016 tot 25-03-2016**
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - ☐ aanpassing aanvraag: **01-03-2016, 25-03-2016**
 - ☐ advies aan CCD: **01-04-2016**
7. Eventueel horen van aanvrager. **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Strekking van de vraag / vragen
 - Strekking van het (de) antwoord(en)

- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **11-12-2015, 10-03-2016**

- Strekking van de vraag / vragen:

- **Algemene vragen/opmerkingen** waren over herhalingen in de tekst, navolgbaarheid van berekeningen en benoemen van go/no go momenten en onduidelijkheden omtrent verfijning. Meer specifieke vragen waren:
- **Opmerkingen t.a.v. de projectaanvraag:**
- Er zit redelijk wat redundantie in het projectvoorstel tussen de beschrijvingen van de achtergrond en het doel. Met name deel 3.2, "Doel" is erg gedetailleerd, er wordt gevraagd om een algemene doelstelling.
- Figuur 1 illustreert de strategie en niet het doel. Deze figuur wordt ook vooral in 3.4.1. aangehaald, zou daar ook beter passen.
- **Opmerkingen t.a.v. de bijlagen:**
- Er staat geen enkele wetenschappelijke referentie in de bijlagen
- **Opmerkingen t.a.v. bijlage 1:**
- Deze bijlage is zonder Figuur 1 uit het projectvoorstel niet te begrijpen, daar wordt veel naar verwezen. Navolgbaarheid is daardoor lastig.
- Overwegingen en statistische methoden: hier staat een lijst getallen van aantallen cellen die verkregen kunnen worden. De vraag 'welke overwegingen en statische methoden gebruikt worden', wordt niet beantwoord.
- Bij **B dieren, de geschatte aantallen** staat een gedetailleerde beschrijving van de experimentele aanpak, dat hoort onder **A**. Is deels een herhaling.
- **Opmerkingen t.a.v. bijlage 2:**
- Is er literatuur onderbouwing dat voor cuprizone mannelijke dieren het best geschikt zijn?
- **Opmerkingen t.a.v. bijlage 3:**
- Lange zinnen, zoals de eerste zin onder A (2,5 regel), maken de inhoud moeilijk te volgen.
- Onder **B, dieren** zouden de berekeningen duidelijker kunnen, bijvoorbeeld wat betekent $2 \times 2 \times 2 \times 5 = 80$?
- Onderdeel **I aantasting welzijn**, is verwarrend. Eerst wordt onder **D. Maatregelen om angst etc. te beperken** gezegd dat zwangere muizen individueel gehuisvest worden, vervolgens wordt gezegd bij **I aantasting welzijn** dat pups vertrapt kunnen worden en dan wordt als **genomen maatregel** gesteld bij dat dieren individueel gehuisvest worden. Is een wat verwarrende redenering.
- Zouden transgene muizen (bv GFP/RFP transgeen) als OPC donor gebruikt kunnen worden als tracer i.p.v. of als aanvulling op PHK26?
- Bij overwegingen en statische methoden wordt niet echt duidelijk welke overwegingen /methoden gebruikt zijn. Aanvrager heeft ruime ervaring met dit werk, waarom geen citaties eigen werk, of toepassen/voorstellen van power analyses indien mogelijk?
- **Opmerkingen t.a.v. bijlage 4:**
- Onder **A. experimentele aanpak** staan achtereenvolgens 1a, 1b en 1d. Waar is 1c?
- Ook staat hier 'Described methods have been succesfully applied in previous work' Hier zouden dan referenties bij moeten staan
- De weergegeven beoogde behandeling zou veel beknopter kunnen, zeker als het al eerder is gedaan en gepubliceerd.
- Bij **overwegingen en statische methoden**: als eerdere gegevens inzicht in benodigde aantallen dieren geven, dan zou u citaties kunnen toevoegen of een power analyse met gegevens van eerder bepaalde parameters kunnen toepassen.
- Onder B. De Dieren: de berekeningen zijn weer lastig te volgen.
- Onderdeel **I aantasting welzijn**, is verwarrend, eerst wordt onder **D. Maatregelen om angst etc. te beperken** gezegd dat zwangere muizen individueel gehuisvest worden, vervolgens wordt gezegd bij **I**

10 december 2014

aantasting welzijn dat pups vertrapt kunnen worden en dan wordt als **genomen maatregel** gesteld bij dat dieren individueel gehuisvest worden. Is een wat verwarrende redenering.

- **Vervolg vragen waren:**
 - **Bijlage 1:**
 - Worden beide geslachten gebruikt, zo ja: aangeven, zo nee: waarom niet?
 - Bij 'B de dieren', is het aantal opgevoerde dieren moeilijk navolgbaar. Kunt u dit meer concretiseren, net als in de andere bijlagen
- Datum antwoord: **01-03-2016, 25-03-2016**
 - Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**
- 9.** Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC). **n.v.t.**
- Aard expertise
 - Deskundigheid expert
 - Datum verzoek
 - Strekking van het verzoek
 - Datum expert advies
 - Expert advies

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet). **Ja**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
- 3.** De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja.**
- 4.** Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **n.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is:
 - ☐ **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **De aanvraag gaat om 4 onderzoeksvragen die als samenhangend doel hebben beter te begrijpen hoe het proces van myelinisatie en demyelinisatie van zenuwuitlopers door oligodendrocyten (de myeline-vormende cellen) gereguleerd wordt, met als uiteindelijke doel nieuwe therapeutische aanknopingspunten voor de ziekte multipale sclerose te ontwikkelen. Er is sprake van een gefaseerde aanpak met duidelijk go / no-go momenten en gegevens verkregen uit de ene onderzoeksvraag vormen de basis voor een gerichte set experimenten voor een andere onderzoeksvraag.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **n.v.t.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, die is realistisch ingeschat.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen. Ja, waar mogelijk voert de onderzoeker in vitro experimenten uit, een deel van het werk kan alleen in levende organismen worden uitgevoerd**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat wetenschappelijk kan worden verantwoord. Het onderzoek wordt gefaseerd uitgevoerd. Veelbelovende middelen worden eerst in cellen getest voordat er dierproeven mee worden uitgevoerd. Daarnaast worden zeer goed beschreven en reproduceerbare diermodellen gebruikt zodat het aantal dieren per experiment zoveel mogelijk beperkt kan blijven.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van

dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt. Om het onderzoek te kunnen vertalen naar de mens is het noodzakelijk om een diersoort te gebruiken waarin de zenuwuitlopers voorzien zijn van myeline. De best beschreven en best gekarakteriseerde proefdieren om de- en remyelinisatie te bestuderen zijn de rat en de muis. Bovendien is (deels) gekozen voor een (de)myelinisatie model met het minste ongerief.**

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. **Ja**

D. Ethische afweging

Onderzoek naar de systemen die myelinisatie reguleren en definiëren is nodig om de basale biologie van het intact en functioneel houden van zenuwuitlopers beter te begrijpen. Het belang voor de mens is dat in de toekomst mogelijk betere therapieën of methoden voor de behandeling van multipale sclerose ontwikkeld kunnen worden, een ziekte waar nu nog geen langdurig effectieve behandeling voor bestaat. Dergelijk onderzoek is deels alleen uit te voeren bij dieren waarin de- remyelinisatie een goed beschreven fenomeen is, zoals de muis en rat. Het gebruik van de diersoort zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen omdat ze ongerief ervaren door de experimentele handelingen, is dit door de onderzoekers zo veel mogelijk beperkt. Ook is serieus zorg besteed aan optimale vervanging, vermindering en verfijning. Daarom concludeert de DEC dat het belang van het onderzoek opweegt tegen het veroorzaakte ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- ☐ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

10 december 2014

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002016504

Bijlagen

2

Datum 1 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016504. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL80ABNA0446049352
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2016
Geplande einddatum: 31 mei 2021
Titel project: Development of therapeutic strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkelen van therapeutische strategieën voor een remyelinisatie therapie in MS
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.584,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: ☒ Projectvoorstel
☒ Beschrijving Dierproeven
☒ Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen: ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Groningen



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD105002016504

Bijlagen

2

Datum 1 april 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 april 2016

Vervaldatum: 1 mei 2016

Factuurnummer: 16700504

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002016504	€ 1.584,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 10 mei 2016 14:52
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD105002016504: aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling getiteld 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504.

Wij hebben nog een aantal vragen over deze aanvraag.

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.

-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is.

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om te antwoorden. De CCD wil uw aanvraag echter graag in haar eerstvolgende vergadering bespreken. Wij zouden daarom de antwoorden graag uiterlijk donderdag 12 mei 2016 ontvangen.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 10 mei 2016 16:58
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: AVD105002016504: Aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project "getiteld 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504.

Wij hebben nog een vraag voor u over deze aanvraag.

U geeft in uw advies aan dat er geen sprake is van bijzondere categorieën. De aanvrager wil echter gebruik maken van een dodingsmethode uit Bijlage IV die alleen gebruikt mag worden indien andere methodes niet gebruikt kunnen worden. Dit dient beoordeeld te worden. De aanvrager geeft daarnaast aan dat alle mannelijke dieren gedurende de proef individueel gehuisvest worden. Dit is niet in overeenstemming met bijlage III. Kunt u aangeven of de aanvrager in beide situaties voldoet aan de vereisten in de Wet?

Wij hebben de aanvrager vandaag de volgende vragen gesteld:

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.

-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is..

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de volgende vergadering wil bespreken, zouden wij graag uiterlijk donderdag 12 mei uw aanvullend advies willen ontvangen.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. RVO.nl is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te

verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

Puntsgewijze reactie op vragen betreffende aanvraag ‘Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis’ (aanvraagnummer AVD105002016504).

Vraag 1

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.

Respons

Het deel van het project waarop de vraag doelt is het treatment model 1 (‘to overcome remyelination failure in an MS lesion environment’) uit bijlage 3.4.4.4. [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] Voorkeur gaat echter uit naar het gebruik van nanopartikels, mede gezien de beoogde translatie naar de klinische setting en vanuit het oogpunt van vermindering van het aantal dieren.

-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

Respons

In deze bijlage worden 3 ‘treatment models’ beschreven. De 3 ‘treatment models’ hebben als doel om methodes die mogelijke het falen van remyelinisatie in MS op heffen, te valideren (zie figuur 1 in onderdeel 3.4.1 van het projectvoorstel dierproeven). Deze validatie wordt pas uitgevoerd als de ‘in vitro’ bevindingen van de ontwikkelde methode (‘tools’) positief zijn (stap 3 uit figuur 1 in onderdeel 3.4.1 van het projectvoorstel dierproeven). Treatment model 1 wordt gestart op de criteria zoals hierboven beschreven. Treatment model 2 (‘to modulate (endogenous) remyelination’) en 3 [REDACTED] kunnen onafhankelijk van de ontwikkeling van de nanopartikels worden uitgevoerd.

Vraag 2

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is.

Respons

In de aanvraag wordt decapitatie als dodingsmethode voor de neonaten beschreven. De neonaten (P1-3) ondervinden meer angst als de dodingsmethode zoals beschreven voor de volwassen dieren -overdosis van nembutal middels IC injectie onder isofluoraan anesthesie- wordt gebruikt. De decapitatie kan ook plaatsvinden na een overdosis isofluoraan anesthesie.

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 12 mei 2016 15:55
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: AVD105002016504: Aanvullende informatie

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED],

Naar mening van de DEC voldoet de aanvrager aan de vereisten in de wet:

T.a.v. de dodingsmethode: andere methodes kunnen niet gebruikt worden, dit omdat het muizen en ratten neonaten (p1-3, 1 week) zijn. Cervicale dislocatie en CO2 methodes kunnen dan niet gebruikt worden en/of zijn minder effectief. Ook van belang in deze discussie is het onderzoeksdoel, zijnde onderzoek naar functie van hersencellen t.a.v. (de)myelinisatie processen, waar beïnvloeding van deze cellen door gebruik van eventuele anesthetica ongewenst is. Decapitatie is dan de enige bruikbare methode in dit type onderzoek.

T.a.v. individuele huisvesting van mannelijke dieren: het optreden van agressie tussen - gezamenlijk gehuisveste mannelijke muizen onderling is een veelvoorkomende gebeurtenis. Dit zal van invloed zijn op de uitkomsten van het experiment. Om dit te voorkomen is individuele huisvesting nodig.

Vr. gr.

From: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Sent: dinsdag 10 mei 2016 16:58
To: [REDACTED]
Subject: AVD105002016504: Aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag van u in behandeling waarover u ons van advies heeft voorzien. Het gaat om het project "getiteld 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504.

Wij hebben nog een vraag voor u over deze aanvraag.

U geeft in uw advies aan dat er geen sprake is van bijzondere categorieën. De aanvrager wil echter gebruik maken van een dodingsmethode uit Bijlage IV die alleen gebruikt mag worden indien andere methodes niet gebruikt kunnen worden. Dit dient beoordeeld te worden. De aanvrager geeft daarnaast aan dat alle mannelijke dieren gedurende de proef individueel gehuisvest worden. Dit is niet in overeenstemming met bijlage III. Kunt u aangeven of de aanvrager in beide situaties voldoet aan de vereisten in de Wet?

Wij hebben de aanvrager vandaag de volgende vragen gesteld:

U geeft in uw aanvraag aan in bijlage 3.4.4.4. nanoparticles nodig te hebben die de blood-brain barrier kunnen passeren. Deze nanoparticles worden op dit moment nog ontwikkeld. Hierdoor is het onduidelijk of dit deel van het project wel uitgevoerd kan worden en de doelstellingen behaald kunnen worden.

-U wordt verzocht, vanuit het oogpunt van haalbaarheid, aan te geven of en zo ja op welke wijze dit deel van het project uitgevoerd zal worden indien de nanoparticles niet beschikbaar komen/niet functioneel blijken te zijn.
-U wordt, vanuit het oogpunt van vermindering, verzocht aan te geven op basis van welke criteria u zult besluiten het onderzoek in deze bijlage te starten.

U geeft in uw aanvraag aan een dodingsmethode te willen gebruiken (decapitatie) die alleen gebruikt mag worden als andere methodes niet gebruikt kunnen worden. U wordt verzocht toe te lichten of daar hier sprake van is..

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de volgende vergadering wil bespreken, zouden wij graag uiterlijk donderdag 12 mei uw aanvullend advies willen ontvangen.

Met vriendelijke groet,



Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. RVO.nl is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,
9713 AV Groningen

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD105002016504

Uw referentie

Bijlagen

1

Datum 02 juni 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 1 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' starten. De vergunning wordt afgegeven van 02 juni 2016 tot en met 31 mei 2021.

Voorwaarden

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) Hoewel u in uw aanvraag wel keuzemomenten beschreven heeft, zijn wij van mening dat de criteria op basis waarvan u zult besluiten target genen te selecteren voor vervolgonderzoek niet in voldoende mate zijn beschreven. Om deze reden hebben wij een voorwaarde opgenomen in de vergunning waarbij de criteria op basis waarvan kandidaat genen geselecteerd worden voor aanvang van het project afgestemd dienen te worden met de IvD. Deze voorwaarde is toegevoegd om te voorkomen dat dieren onnodig ongerief ondergaan.

2) In Art. 10a2, lid 2 sub d wordt vereist dat wij een analyse maken van de schade en de baten die het project oplevert, waarbij wordt nagegaan of de schade in de vorm van pijn, lijden, angst of blijvende schade bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het te verwachte resultaat met inachtneming van de ethische overwegingen, en op termijn voordelen kan opleveren voor mens, dier of milieu. Wij zijn niet overtuigd van de haalbaarheid van die doelstellingen in uw project waarvoor gebruik gemaakt gaat worden van treatment model 1. De haalbaarheid van dit model is namelijk afhankelijk van nanopartikels die momenteel nog in ontwikkeling zijn. Om die reden hebben wij een voorwaarde toegevoegd waarbij u voor aanvang van treatment model 1 dient aan te tonen dat de te gebruiken nanopartikels bewezen effectief zijn en de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Deze onderbouwing dient ter goedkeuring aan ons te worden voorgelegd. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. Dit betekent dat u pas met treatment model 1 in bijlage 3.4.4.4 mag starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is ontvangen op 1 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is het advies betrokken

Datum

02 juni 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002016504

overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Op 12 mei 2016 heeft de DEC ons van aanvullend advies voorzien over de te gebruiken dodingsmethoden en het individueel huisvesten van de dieren. Wij kunnen ons vinden in het aanvullend advies van de DEC. Bij de beoordeling van uw aanvraag is zowel het advies als het aanvullend advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Wij nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van bovenstaande afwijkingen. Met het oog op artikel 10a, lid 1 van de wet wordt een algemene voorwaarde toegevoegd.

Wij hebben u op 10 mei 2016 om aanvullende informatie gevraagd over de haalbaarheid van het project i.v.m. het gebruik van nanopartikels die momenteel nog in ontwikkeling zijn en het gebruik van een in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU (Art. 13c, lid 1) beschreven dodingsmethode waarvoor aanvullende voorwaarde gelden. Op 12 mei 2016 heeft u digitaal gereageerd op onze vragen. Zoals hierboven uiteengezet kunnen wij ons slechts deels vinden in de nadere verduidelijking van uw aanvraag wat betreft het gebruik van de nanopartikels en hebben daarom een opschortende voorwaarde opgenomen in de vergunning.

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen we u in ieder geval de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het aanvraagnummer te vermelden. U vindt deze gegevens in de rechter kantlijn in deze brief.

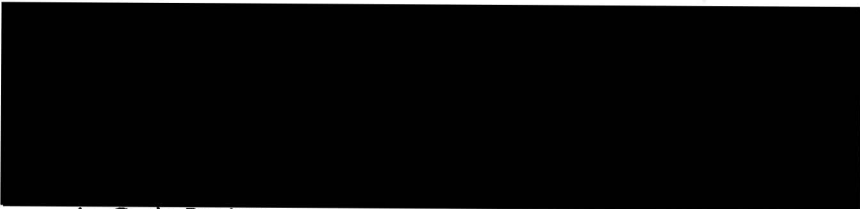
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft

Datum

02 juni 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002016504

vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen**- Vergunning**

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

Datum

02 juni 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002016504



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Rijksuniversiteit Groningen
Adres: A. Deusinglaan 1
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 juni 2016 tot en met 31 mei 2021, voor het project 'Development of strategies for a regenerative therapy for multiple sclerosis' met aanvraagnummer AVD105002016504, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 april 2016;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 april 2016;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 1 april 2016;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 1 april 2016;
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 12 mei 2016;
 - e. Aanvullend advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 12 mei 2016.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Primary cell culture models	Ratten	3280	Licht	Embryo's E15-E17: 200 Neonaten (P1-3): 2000 Neonaten (1 week): 600 Zwangere vrouwtjes: 280 9 maanden: 100 20 maanden: 100
3.4.4.2. Cuprizone model	Muizen	160	Licht	
3.4.4.3. Transplantation model	Muizen	474	Licht: 44% Matig: 56%	Ontvangers: 264 Donoren, zwangere vrouwtjes: 10 Donoren, neonaten: 80 Donoren, 4 maanden: 60 Donoren, 16 maanden: 60
3.4.4.4. Treatment models	Muizen	450	Licht: 53% Matig: 47%	C57BL/6 8-12 weken: 120 [Redacted]

Voorwaarden

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

- 1) De criteria op basis waarvan besloten zal worden kandidaat genen te selecteren voor vervolgprouven dienen voor aanvang van het project afgestemd te worden met de IvD.

Datum

02 juni 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD105002016504

2) Voor aanvang van treatment model 1 dient u aan te tonen dat de te gebruiken nanopartikels bewezen effectief zijn en de bloed-hersenbarrière kunnen passeren. Deze onderbouwing dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van de aanvullende informatie beoordelen of treatment model 1 al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. U mag pas met treatment model 1 in bijlage 3.4.4.4 starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.

Algemene voorwaarde

1) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn.

In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

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

Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

Einde van een dierproef

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

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

Datum

02 juni 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD105002016504

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

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