

| Inventaris Wob-verzoek W17-07 |   |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|-------------------------------|---|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| nr.                           | document NTS2016751                               | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
|                               |   | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| 1                             | Aanvraagformulier                                 |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                             | Projectvoorstel                                   |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 3                             | Niet-technische samenvatting                      | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 5                             | Bijlage beschrijving dierproeven 1                |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 6                             | Bijlage beschrijving dierproeven 2                |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 7                             | Bijlage beschrijving dierproeven 3                |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 8                             | DEC-advies  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                             | Ontvangstbevestiging                              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                            | Verzoek om nadere aanvulling CCD - email          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 11                            | Verzoek om nadere aanvulling CCD                  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 12                            | Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD-email |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 13                            | Reactie op verzoek om nadere aanvulling CCD       |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 14                            | Advies CCD  |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 15                            | Beschikking en vergunning                         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

*Administratieve gegevens*

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

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*
- Ja > *Vul uw deelnemernummer in* 11557  
 Nee > *U kunt geen aanvraag doen*
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.
- |   |                              |
|---|------------------------------|
| Naam instelling of organisatie                      | UMC Utrecht                  |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted]                   |
| KvK-nummer  | 30244197                     |
| Straat en huisnummer                                | Instantie voor Dierenwelzijn |
| Postbus   | 12007                        |
| Postcode en plaats                                  | 3501AA Utrecht               |
| IBAN  | NL27INGB0000425267           |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Universiteit Utrecht         |
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.
- |                             |                     |   |
|-----------------------------|---------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted]          | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | Associate Professor |   |
| Afdeling                    | [Redacted]          |   |
| Telefoonnummer              | [Redacted]          |   |
| E-mailadres                 | [Redacted]          |   |
- 1.5 *(Optioneel)* Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.
- |                             |                            |   |
|-----------------------------|----------------------------|---|
| (Titel) Naam en voorletters | [Redacted]                 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | Post-doctoraal onderzoeker |   |
| Afdeling                    | [Redacted]                 |   |
| Telefoonnummer              | [Redacted]                 |   |
| E-mailadres                 | [Redacted]                 |   |

- 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 1 - 12 - 2016
- Einddatum 1 - 12 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bescherming en herstel van hersenschade bij pasgeborenen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC Bureau van de DEC Utrecht
- Postadres Huispostnummer D01.343  
Postbus 85500  
3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 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 1.7). 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.

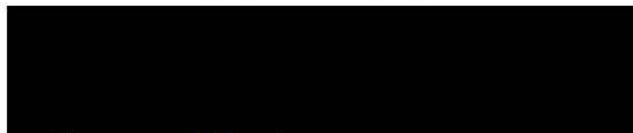
Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



16-11-2016





## Format Projectvoorstel dierproeven

- i. Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- ii. Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- iii. Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- iv. 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.

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

## **Algemene introductie**

Hersenschade in pasgeboren baby's is een zeer ernstig klinisch probleem met levenslange consequenties voor de patiënten, hun familie en de maatschappij. In de kliniek onderscheiden we momenteel twee belangrijke patiëntengroepen op basis van hun ontwikkelingsfase: de voldragen baby's met acute hersenschade als gevolg van zuurstofgebrek bij de geboorte en de te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof hersenschade met of zonder focale laesies. Voor beide patiënten groepen zijn momenteel, naast acute hypothermie (koeling) voor voldragen baby's met ernstige acute hersenschade, geen therapieën beschikbaar. Onze aanvraag richt zich op het verrichten van wetenschappelijk en translationeel onderzoek naar het in kaart brengen van de pathofysiologie van deze typen hersenschade bij pasgeboren baby's en naar mogelijke nieuwe therapieën voor deze patiënt-doelgroepen.

Hersenschade bij het pasgeboren kind wordt in veel gevallen veroorzaakt door neonatale hypoxie-ischemie (HI). HI is een conditie van verlaagde zuurstofvoorziening (hypoxie) en doorbloeding (ischemie) in de organen, waaronder de hersenen. Door een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen (o.a. glucose), en een ophoping van afvalstoffen kan een HI insult in de hersenen weefselschade veroorzaken. Wereldwijd ondervinden 1.15 miljoen pasgeboren baby's (8.5 per 1000 levend geboren) een HI insult, wat in 25% leidt tot peri- of postnatale sterfte (jaarlijks 287.000 levend geboren). Van de pasgeboren baby's die het HI insult overleven ontwikkelt 35% permanente neurologische afwijkingen. Jaarlijks betreft dit naar schatting 414.000 pasgeboren baby's (1).

Het tekort aan zuurstof en glucose veroorzaakt verhoogde membraan depolarisatie en verstoorde ATP-afhankelijke glutamaat heropname vanuit de synapsspleet. Glutamaat excitotoxiciteit kan leiden tot celdood van neuronen (zenuwcellen) en oligodendrocyten (OGDs; gliacellen die myeline maken), onder andere via de productie van vrije radicalen zoals stikstofoxide. Deze cascade activeert tevens de andere gliacellen in de hersenen, t.w. microglia en astrocyten, wat leidt tot een inflammatoire respons op de plaats van het insult. Inflammatie, zowel in de hersenen als systemisch, veroorzaakt meer neuronale celdood en uiteindelijk meer weefselschade. De mate van permanente hersenschade na HI is afhankelijk van de ernst en de duur van het insult. Daarnaast is de pathogenese en klinische prognose afhankelijk van de locatie van de hersenschade en van het ontwikkelingsstadium van de hersenen (gestatie-leeftijd). De experimenten beschreven in **Bijlage I** van dit projectvoorstel hebben betrekking op zuurstofgebrek-(HI)-geïnduceerde hersenschade in zowel voldragen als te vroeg geboren baby's.

Onderzoek naar neuroprotectie (bescherming) en neuroregeneratie (herstel) van de pasgeboren hersenen heeft zich de afgelopen twee decennia met name gericht op de bovengenoemde zuurstofgebrek-(HI)-geïnduceerde hersenschade. Hoewel HI inderdaad een prominente oorzaak is van neonatale hersenschade, toont recent preklinisch (2) en klinisch (3) onderzoek aan dat perifere inflammatie een belangrijke (bijdragende) rol speelt bij het ontstaan van neuroinflammatie en daaropvolgende hersenschade. Inflammatie tijdens de zwangerschap (maternale inflammatie) zorgt voor immuun activatie in de uterus en vervolgens voor neuroinflammatie in de hersenen van het ongeboren kind. Maternale inflammatie is één van de belangrijkste oorzaken van vroeggeboorte. Deze te vroeg geboren baby's hebben vervolgens een groot risico op zuurstoftekort omdat de longen van de prematuur onvoldoende ontwikkeld zijn. De experimenten beschreven in **Bijlage II** van dit projectvoorstel hebben betrekking op hersenschade in te vroeg geboren baby's als gevolg van [REDACTED]

## **Doelgroepen voor onderzoek binnen deze projectaanvraag**

In de afgelopen 15 jaar heeft [REDACTED] succesvol onderzoek gedaan naar het opzetten van klinisch-relevante/translationele diermodellen om hersenschade in de verschillende neonatale patiënt-doelgroepen na te bootsen, alsmede naar nieuwe behandelmethoden voor deze typen hersenschade.

Deze projectaanvraag betreft onderzoek naar neonatale hersenschade van **drie patiënt-doelgroepen**:

1. Voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie
2. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies
3. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie,

gekaracteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies

### **Pathologie van hersenschade in de drie doelgroepen**

#### Doelgroep 1. Hersenschade in voldragen baby's

In voldragen pasgeboren baby's is hersenschade in de meeste gevallen het gevolg van acute asfyxie (verstikking) rondom of na de geboorte (perinataal of postnataal, resp.). Perinatale oorzaken omvatten afknelling van de navelstreng, placenta-loslating en placenta insufficiëntie. Postnatale oorzaken zijn ernstige ademhalingsproblemen, hartfalen, sepsis en shock. Perinatale HI in voldragen baby's leidt tot hersenschade in de grijze stof, omdat het celdood induceert van neuronen in breingebieden die gevoelig zijn voor zuurstoftekorten, zoals de basale ganglia, de thalamus en de hippocampus. Deze vorm van hersenschade wordt nagebootst in pasgeboren ratten of muizen door ze bloot te stellen aan HI tussen postnatale dag P7 en P9 (**Diermodel 1, Bijlage I**). Er is nauwkeurig in kaart gebracht dat tussen deze dagen de hersenontwikkeling van de knaagdieren te vergelijken is met een humaan voldragen brein (4). Deze HI hersenschade in de knaagdieren wordt gekarakteriseerd door neuronale celdood en cysteuze laesies in de grijze stof van de cortex, hippocampus en thalamus. Deze modellen worden al jarenlang wereldwijd en XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX gebruikt om therapieën te ontwikkelen voor deze groep patiënten XXXXXX

#### Doelgroep 2 & 3. Hersenschade in te vroeg geboren baby's

Wanneer een schadelijk herseninsult vroeger in gestatie plaatsvindt wegens vroeggeboorte (meestal <32 weken gestatie-leeftijd; normale zwangerschapsduur is 40 weken), zorgt dit vooral voor (niet-cysteuze) schade in de witte stof. In deze witte stof ontwikkelen zich de zenuwuitlopers die verschillende hersengebieden met elkaar verbinden. Beschadiging van de witte stof heeft daarom ernstige consequenties voor aansturing van o.a. motoriek en cognitie. De zenuwuitlopers in de witte stof zijn omhuld met myeline, wat de uitlopers beschermt en signaaltransductie tussen neuronen versnelt. Het proces van myelinevorming rond zenuwuitlopers, ook wel myelinisatie genoemd, vindt plaats in de laatste weken van de zwangerschap en na de geboorte. Oligodendrocyten (OGDs) zijn de cellen in de hersenen die zenuwuitlopers voorzien van myeline. In de hersenen van te vroeg geboren baby's bevinden zich veel voorloper-OGDs, die gevoelig zijn voor inflammatie en zuurstoftekort. Inflammatie en zuurstoftekort zijn dan ook de twee grootste risicofactoren voor het ontstaan van witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's. Wanneer de voorloper-OGDs beschadigd raken door een inflammatoir en/of hypoxisch milieu, zullen deze cellen niet differentiëren tot volwassen OGDs, waardoor myelinisatie niet kan plaatsvinden. Dit leidt tot de karakteristieke witte stof hersenschade zoals wordt aangetroffen in de hersenen van te vroeg geboren baby's. Hoe het precies komt dat deze voorloper-OGDs niet differentiëren tot volwassen OGDs is echter grotendeels onbekend. Tevens is onbekend of de inflammatie en/of het hypoxisch milieu alleen zorgt voor differentiatie-arrest, of tevens zorgt voor celdood van voorloper-OGDs. Recente studies suggereren dat de andere gliale cellen (t.w. microglia en astrocyten) van het brein betrokken zijn bij het ontstaan van witte stof hersenschade, maar meer onderzoek is nodig om te ontrafelen hoe belangrijk deze cellen in de pathogenese van hersenschade in te vroeg geboren baby's zijn.

Er zijn vele vormen van witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's, maar recent onderzoek heeft aangewezen dat *niet-cysteuze diffuse witte stof schade* de belangrijkste en meest voorkomende vorm is. Niet-cysteuze diffuse witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan zowel *met* focale laesies (35% van de witte stof schade in te vroeg geboren baby's) als *zonder* focale laesies (57% van de witte stof schade in te vroeg geboren baby's) voorkomen. Voor deze beiden vormen van witte stof hersenschade hebben we een apart diermodel gevalideerd.

Niet-cysteuze diffuse witte stof schade *met* focale laesies (doelgroep 2) wordt nagebootst in muizen door ze bloot te stellen aan HI met inflammatie (d.m.v. lipopolysacchariden; LPS) tussen postnatale dag P4 en P6 (**Diermodel 2, Bijlage I**). Op deze dagen is de hersenontwikkeling te vergelijken met een humaan prematuur brein van 28-32 weken gestatie-leeftijd (4). De witte stof schade die wordt geïnduceerd komt overeen met de schade die kan worden waargenomen in te vroeg geboren baby's: de focale laesies in de witte stof zijn niet-cysteus, microglia en astrocyten zijn geactiveerd, er is verlies van voorloper-OGDs en myeline, en de ventrikels zijn vergroot (8,9).

Diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies (doelgroep 3) wordt geïnduceerd in ratten door

blootstelling aan systemische [redacted] gevolgd door [redacted] **Diermodel 3, Bijlage II**). De schade komt overeen met de typische diffuse vorm van witte stof hersenschade *zonder* focale laesies zoals tevens kan worden waargenomen in te vroeg geboren baby's: er is diffuse activatie van microglia en astrocyten, differentiatie arrest van voorloper-OGDs en verlies van myeline, en er zijn geen focale laesies waar te nemen [redacted]

**Behandeling van neonatale hersenschade**

Neonatale hersenschade ontwikkelt zich over een periode van weken na het daadwerkelijke insult, waardoor er mogelijkheden zijn voor therapeutische interventies. Helaas zijn deze tot op heden erg beperkt. Tot dusver is hypothermie, t.w. koeling van de hersenen of het gehele lichaam tot 33.5°C, de enige effectieve interventie voor het verlagen van mortaliteit en morbiditeit in voldragen baby's met hersenschade. De huidige hypothese suggereert dat celdood geremd wordt door het verlagen van het cellulaire metabolisme (aangezien minder zuurstofconsumptie leidt tot minder opstapeling van vrije radicalen). Hypothermie is alleen effectief bij voldragen baby's met perinatale asfyxie en matige tot ernstige hersenschade, mits de behandeling binnen 6 uur gestart wordt. Hypothermie kan vroeg de schade gedeeltelijk remmen, maar zorgt niet voor heropbouw van hersenweefsel. Er is daarom behoefte aan nieuwe behandelmethoden (al dan niet in combinatie met hypothermie).

**Onderverdeling van de projectaanvraag**

De behandelmethoden die we in deze projectaanvraag onderzoeken kunnen worden onderverdeeld in twee groepen: **1) neuroprotectie**, gericht op bescherming tegen vroege schade, of **2) neuroregeneratief**, gericht op herstel en heropbouw van neurale weefsel. De neuroprotectieve benadering omvat het remmen van A) celdood en B) neuroinflammatie relatief vroeg na het insult. De neuroregeneratieve benadering omvat A) aanmaak van nieuw weefsel m.b.v. stamceltherapie, B) stimuleren van celgroei m.b.v. behandeling met groeifactoren en [redacted] [redacted] zie ook **figuur 1**).

| Deelproject         | Onderwerp                                     |
|---------------------|---|
| 1. Neuroprotectie   |   |
| A.                  | Remmen van celdood                            |
| B.                  | Remmen van inflammatie                        |
| 2. Neuroregeneratie |   |
| A.                  | Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie |
| B.                  | Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren  |
| C.                  | [redacted]                                    |

**1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)**

**Deelproject 1A. Remmen van celdood**

Na een insult in de hersenen kunnen de zenuwcellen op verschillende wijzen afsterven. Het is bekend dat celdood in de neonatale hersenen voornamelijk via apoptotische (geprogrammeerde) celdood-cascades verloopt. De laatste jaren is er door [redacted] en andere groepen veel onderzoek verricht om in kaart te brengen welke eiwitten cruciaal zijn bij het aanzetten van de apoptotische cascade in de neonatale hersenen. Zo heeft [redacted] [redacted] ontdekt dat het mitochondrium (de energiecentrale van de cel) een van de belangrijke intracellulaire locaties is waar de start van apoptose plaatsvindt [redacted]

Een zeer belangrijke ontdekking door onze groep is dat de eiwitten JNK en p53 vroeg na de start van HI (0-6 uur na HI) aan de mitochondriën binden en dat deze binding danwe [redacted] van de eiwitten terplekke met andere eiwitten het startsein geeft voor celdood [redacted]. Middels peptide remmers van [redacted] JNK (7,16) ofwel [redacted] p53 (PFT-mu; [redacted]) o.a. aangetoond dat het *kortdurend* remmen van [redacted] JNK of p53 zeer sterk de laesiegrootte in de hersenen verkleint en de motorisch en cognitieve functie van de dieren verbetert (o.a. [redacted] [redacted] tevens aangetoond dat het remmen van deze mitochondriale eiwitten in de hersenen de meeste



potentie heeft als dit binnen 6 uur na het insult gebeurt.

Belangrijk om te vermelden is dat JNK en p53 ook een belangrijke rol spelen als transcriptiefactoren bij de ontwikkeling van de hersenen (bv. p53 is een belangrijk tumor-suppressor gen). Bij onze experimenten is het daarom goed te benadrukken dat wij *kortdurend* alleen de *HI-geïnduceerde* activiteit van JNK of p53 remmen, en dus niet de *basale* activiteit die nodig is voor normale hersenontwikkeling. Bovendien worden bij de experimenten die wij uitvoeren alleen remmers gebruikt die specifiek de [REDACTED] JNK of p53 remmen. Bekend is dat voor tumorsuppressor gen werking van p53, het p53 eiwit in de celkern moet zitten en gedurende langere tijd gemuteerd of uitgeschakeld moet zijn (17). [REDACTED] echter aangetoond dat [REDACTED] remmers max 12 uur werken. Een tumorigene werking van deze remmers is dan ook niet te verwachten. [REDACTED] tevens geen negatieve lange-termijn effecten gevonden in de hersenen van behandelde dieren (15,16). Voor de remmers van JNK en p53 zijn [REDACTED] [REDACTED] reeds zowel dosis response- als therapeutische window-experimenten uitgevoerd waardoor de optimale doses en optimale behandelingsstrategie bekend zijn (t.w. 8 mg/kg PFT-mu en 10 mg/kg JNK-remmer, binnen 6 uur na HI).

De verschillende cascades die worden aangezet tijdens apoptose beïnvloeden elkaar als een soort sneeuwbal wat uiteindelijk leidt tot DNA schade en dood van de zenuwcel. [REDACTED] dat het van belang is om zoveel mogelijk bovenaan in deze cascade (t.w. op mitochondriaal niveau) in te grijpen, zodat zoveel mogelijk downstream effecten geremd worden (**figuur 1**, linksboven). Als voorbeeld, het remmen van [REDACTED] p53 of JNK is dus veel effectiever dan het remmen van één specifieke downstream caspase. Het is tot dusver niet bekend of er een [REDACTED] JNK en p53 aan het mitochondrium plaats vindt en of het remmen van [REDACTED] [REDACTED] nog effectiever kan zijn dan de p53- of JNK-remmers die [REDACTED] hebben gebruikt. Tevens is het van belang om [REDACTED] p53 en JNK met [REDACTED] [REDACTED] aan het mitochondriale membraan nader te bestuderen.

Preklinisch onderzoek heeft dus aangetoond dat het remmen van celdood een potentiële behandelingsstrategie is voor hersenschade in voldragen baby's, maar het is niet bekend of het remmen van celdood, bv specifiek van voorloper-OGD, ook witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan voorkomen. Bestuderen wat behandeling met de [REDACTED] p53/JNK remmers zou kunnen doen op witte stof hersenschade is dan ook een zeer interessante onderzoeksvraag, te meer omdat het bekend is dat voorloper-OGD door *apoptotische* celdood sterven in het premature brein.

### **Deelproject 1B. Remmen van inflammatie**

Neuroinflammatie is één van de belangrijke processen betrokken bij het ontstaan van neonatale hersenschade (**figuur 1**, linksonder). Geactiveerde microglia en astrocyten scheiden cytokines en chemokines uit, wat zorgt voor een inflammatoire respons op de plaats van het insult met het gevolg dat perifere immuuncellen worden aangetrokken. Inflammatie veroorzaakt meer demyelinisatie, meer celdood en dus meer weefselschade. [REDACTED] hebben in eerdere studies aangetoond dat het afremmen van neuroinflammatie door o.a. het remmen van TNF $\alpha$  of het remmen van microglia een positieve uitkomst geeft op HI hersenschade (7). Er is nog niet uitgezocht of het remmen van TNF $\alpha$  of de microglia ook witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan voorkomen. Verder is er steeds meer bekend geworden dat de rol van TNF $\alpha$  afhankelijk is van het type TNF-receptor waaraan gebonden wordt. Het moduleren van de TNF $\alpha$  cascade o.a. door het toepassen van [REDACTED] [REDACTED] kan helpen om de rol van TNF $\alpha$  tijdens neonatale hersenschade verder op te helderen. Ook is er tot dusver weinig bekend wat het stimuleren van anti-inflammatie kan doen op hersenschade in het neonatale brein. Zo is er een [REDACTED] ontwikkeld van 2 belangrijke anti-inflammatoire cytokinen [REDACTED] wat in andere inflammatoire condities veelbelovend inflammatie kan afremmen. Bestuderen wat behandeling met anti-inflammatoire cytokinen zou kunnen doen op HI hersenschade dan wel witte stof hersenschade lijkt een zeer interessante strategie.

Voor de TNF-R [REDACTED] [REDACTED] experimenten zullen dose-response- en therapeutisch window experimenten worden uitgevoerd. Van de TNF-a remmer etanercept er [REDACTED] zullen we de dosis baseren op in de literatuur beschreven doses die effectief zijn bij neonatale hersenschade na acute asfyxie (18, 19).

## **2. Neuroregeneratie (gericht op herstel en heropbouw van neuraal weefsel)**

### **Deelproject 2A. Aanmaak van nieuw neuraal weefsel (m.b.v. stamceltherapie)**



[REDACTED]

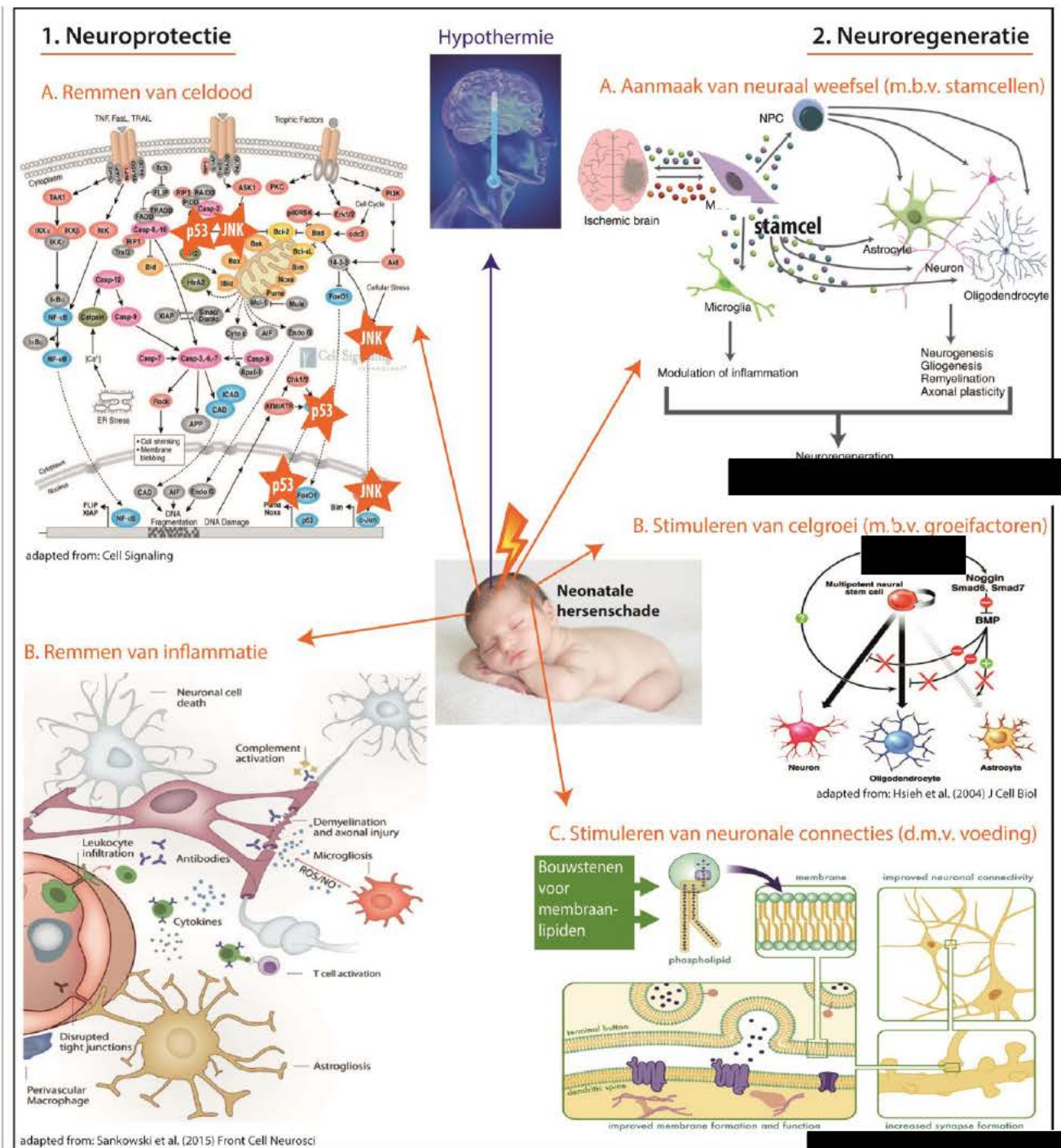
**Referenties**

[REDACTED]

Lee et al. 2013 *Pediatr Res*  
Wang et al. 2009 *J Immunol*  
Nelson et al. 2000 *Curr Opin Neurol*  
Salmaso et al. 2014 *Nat Neurosci*  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
Shen et al. 2010 *J Vis Exp*  
Shen et al. 2012 *J Neurosci Res*  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
vd Kooij et al. 2010 *Brain Behav Immunol*  
Van der Kooij et al. 2010 *Neurobiol Dis*  
[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]  
Vaseva & Moll. 2009 *Biochim Biophys Acta*  
[REDACTED]  
Mesples et al. 2003 *Brain Res Dev*  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
Lin et al. 2009 *Exp neurol*  
Cai et al. 2011 *Neurosci*  
[REDACTED]  
Pallier et al. 2015 *Neurobiol Dis*  
Enry et al. 2015 *Nat Neurosci*  
Berer et al. 2011 *Nature*  
Mayer et al. 2015 *J Clin Invest*  
D’Mello et al. 2015 *J Neurosci*  
Smith et al. 2014 *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*



**Figuur 1.** De deelprojecten van de projectaanvraag richten zich op: 1A) remmen van inflammatie, 2A) aanmaak van nieuw neurale weefsel, 2B) stimuleren van celgroei, en 2C) stimuleren van neuronale connecties.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- iv. 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?
- v. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

### **Algemene doelstelling**

Het algemene doel van deze gehele projectaanvraag is het identificeren en testen van mogelijke neuroprotectieve en neuroregeneratieve therapeutische interventies voor neonatale hersenschade in klinisch relevante diermodellen voor de drie patiënten-doelgroepen die we hierboven hebben gedefinieerd, t.w. 1) voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie, 2) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies, en 3) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies.

Voor het **identificeren** van therapeutische interventies onderzoeken we de mechanismen die betrokken zijn bij neonatale hersenschade. Het is bekend dat neonatale hersenschade ontstaat uit een gecompliceerde interactie tussen verschillende pathofysiologische mechanismen. Deze interactie vindt niet alleen plaats tussen de verschillende cellen in de hersenen (zenuwcellen, oligodendrocyten, microglia en astrocyten), maar betreft daarbuiten bijvoorbeeld ook de endotheelcellen die de bloed-hersen barrière vormen en verscheidene typen perifere immuun cellen die de plaats van de laesie kunnen infiltreren. Meer kennis over deze mechanismen kan zorgen voor effectievere combinaties van neuroprotectieve en neuroregeneratieve strategieën ter behandeling van neonatale hersenschade.

Voor het **testen** van therapeutische interventies, richten we ons op zowel bescherming (neuroprotectie) als op herstel (neuroregeneratie) van het pasgeboren brein. In ongeveer de helft van de pasgeboren baby's met hersenschade is het startmoment van het insult exact definieerbaar, waardoor in de vroege periode na HI (meestal binnen 6 uur na HI) de hersenen **beschermd** kunnen worden tegen vroege schade. Bij de andere helft van de pasgeborenen met hersenschade is het insult chronischer van aard of pas later waargenomen, waardoor het startmoment minder goed definieerbaar is. Voor deze groep patiënten zijn therapieën nodig die zich niet richten op remmen van vroege schade (omdat men daarvoor te laat is), maar zich richten op **inductie van herstel**.

### **Doelstellingen en onderzoeksvragen per deelproject**

Hieronder hebben we per deelproject de bijbehorende doelstelling en onderzoeksvragen geformuleerd. Allereerst is een beknopte samenvatting gegeven van de doelstellingen per deelproject, die uitgebreider worden geformuleerd met bijbehorende onderzoeksvragen in de onderstaande tekst.

Samenvatting van de doelstellingen per deelproject:

1. **Neuroprotectie**
  - A.** Remmen van celdood cascades
    - i. Bestuderen of het remmen van de ██████████ JNK en P53 aan het ██████████ membraan een effectievere therapie is dat het alleen remmen van JNK ofwel p53 ter bescherming van neuronale celdood als gevolg van acute asfyxie.
    - ii. Testen of P53 en JNK remmers bijdragen aan het voorkomen van diffuse witte stof hersenschade
  - B.** Remmen van inflammatie
    - i. Testen of ingrijpen in de TNF $\alpha$  cascade beschermt tegen neuroinflammatie en daaruit voortkomende hersenschade
    - ii. Testen of anti-inflammatoire cytokines neuroinflammatie remmen en op die wijze hersenschade kunnen verminderen
2. **Neuroregeneratie**
  - A.** Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie
    - i. Onderzoeken of hypothermie de potentie en het therapeutische window van stamceltherapie beïnvloedt
    - ii. Onderzoeken of stamceltherapie witte stof hersenschade kan herstellen
    - iii. Optimaliseren van de neuroregeneratieve capaciteit van stamcellen ██████████ ██████████
    - iv. Ophelderen van de intranasale route die stamcellen volgen naar het schadegebied en de daarbij betrokken ██████████ ██████████
  - B.** Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren

- i. Onderzoeken welke (combinatie van) groeifactoren zorgen voor functioneel herstel na witte stof hersenschade

## 1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)

### **Deelproject 1A.** Remmen van neuronale en OGD celdood

- Doelstellingen:
  - i. Omdat het dusver niet bekend is welk eiwit in de celdood cascades het beste doelwit is om hersenschadeschade te remmen, is het doel van dit deelproject de effectiviteit van eiwitremmers van ( ) de P53 en JNK cascades te testen ter bescherming van neuronale celdood als gevolg van acute asfyxie (doelgroep 1).
  - ii. Daarnaast is het is niet bekend of het remmen van OGD celdood witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's kan voorkomen (doelgroep 3). Het tweede doel is daarom het testen van effectiviteit van P53 en JNK remmers ter voorkoming van diffuse witte stof hersenschade.
- Onderzoeksvragen:
  - i. Helpt aangrijpen in de p53 en JNK cascades bij het voorkomen van mitochondriële schade na acute asfyxie (doelgroep 1)?
  - ii. Helpt remming van de P53 of JNK cascade ter voorkoming van diffuse witte stof hersenschade (doelgroep 3)?

### **Deelproject 1B.** Remmen van inflammatie

- Doelstellingen:

Neuroinflammatie kan geremd worden middels i.) het *remmen* van pro-inflammatoire cytokines of ii.) het *stimuleren* van een anti-inflammatoire respons.

  - i. TNFa is een van de belangrijkste pro-inflammatoire cytokines geproduceerd in de hersenen. Het moduleren van de pro-inflammatoire TNFa cascade zal worden bewerkstelligd door het toedienen van specifieke
  - ii. Anti-inflammatoire cytokines zoals en remmen inflammatie. werken aan de anti-inflammatoire effecten van een van . Het doel van dit deelproject is onderzoeken of bijdragen aan bescherming van de hersenen door remming van neuroinflammatie.

Omdat neuroinflammatie een belangrijke rol speelt bij zowel hersenschade als gevolg van acute asfyxie en diffuse witte stof schade willen we bovengenoemde strategieën onderzoeken in modellen voor doelgroep 1 en 3.
- Onderzoeksvragen:
  - i. Kan neuroinflammatie geremd worden door het moduleren van de TNFa cascade en vervolgens het brein beschermen tegen hersenschade als gevolg van acute asfyxie of diffuse witte stof schade (doelgroep 1, resp 3)?
  - ii. Kunnen anti-inflammatoire cytokines of het neuroinflammatie remmen als gevolg van acute asfyxie of diffuse witte stof schade (doelgroep 1, resp 3)?

## 2. Neuroregeneratie (gericht op herstel en heropbouw van neuraal weefsel)

### **Deelproject 2A.** Aanmaak van nieuw neuraal weefsel (m.b.v. stamceltherapie)

- Doelstellingen:

Ons voorgaand onderzoek heeft laten zien dat stamceltherapie een veelbelovende toepassing is voor herstel van neonatale hersenschade.

  - i. Omdat hypothermie (koelen) op dit moment standaard klinische zorg is na acute asfyxie (doelgroep 1), is het van belang te onderzoeken of hypothermie de potentie en het therapeutische window van stamceltherapie beïnvloedt.
  - ii. heeft laten zien dat stamceltherapie neuronale schade na acute asfyxie kan herstellen en het gedrag van de muizen kan verbeteren. In dit

zullen wij bestuderen of stamceltherapie ook witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's (doelgroep 2) kan herstellen.

- iii. [redacted] onderzoek heeft laten zien dat stamceltherapie zorgt voor substantieel maar niet volledig herstel van hersenschade. Modificaties van stamcellen, o.a. door een andere [redacted] te gebruiken (bv [redacted]-stamcellen of [redacted] stamcellen) of dmv optimale kweekcondities of [redacted] van [redacted], kunnen daarom de potentie van stamceltherapie vergroten voor hersenschade als gevolg van acute asfyxie en witte stof hersenschade (doelgroep 1, resp 2).
- iv. Om intranasale toepassing van stamcellen zo effectief en veilig mogelijk te maken, wordt onderzocht welke route de stamcellen vanuit de neusholte volgen naar het schadegebied en welke [redacted] hierbij een rol spelen (doelgroep 1).
- Onderzoeksvragen:
  - i. Beïnvloedt hypothermie (koeling) de potentie en het therapeutische window van stamceltherapie? (doelgroep 1)
  - ii. Is het mogelijk schade in de witte stof te herstellen en verbetering van functie te bewerkstelligen middels stamceltherapie? (doelgroep 2)
  - iii. Kunnen modificaties van de stamcellen, d.m.v. andere bron, optimale kweekcondities of [redacted] van [redacted] [redacted], de potentie van stamceltherapie vergroten? (doelgroep 1 en 2)
  - iv. Welke migratieroute wordt gebruikt en welke [redacted] zijn betrokken bij migratie van stamcellen vanuit de neusholte naar de laesie? (doelgroep 1)

#### **Deelproject 2B. Stimuleren van celgroei (m.b.v. groeifactoren)**

- Doelstellingen:
  - i. Omdat *in vitro* experimenten laten zien dat bijvoorbeeld de groeifactor [redacted] belangrijk is bij het uitrijpen van oligodendrocyte voorlopercellen naar volwassen oligodendrocyten die myeline kunnen maken, willen we onderzoeken of [redacted] ook *in vivo* zorgen voor OGD maturatie en kunnen leiden tot herstel van witte stof hersenschade (doelgroep 2).
- Onderzoeksvragen:
  - i. Welke groeifactoren kunnen uitrijping van OGDs stimuleren en witte stof schade herstellen? Welke combinaties van groeifactoren zorgen voor het grootste functioneel herstel na witte stof hersenschade? (doelgroep 2)

[redacted]

- [redacted]
  - [redacted]
  - [redacted]
  - [redacted]
- [redacted]
  - [redacted]
  - [redacted]

#### **Haalbaarheid van het project**

De deelprojecten worden uitgevoerd door verschillende AIO's, biotechnici en post-doctoraal onderzoekers binnen de onderzoeksgroep. Dit geeft de gelegenheid om de deelprojecten in parallel uit te voeren. Hierdoor zullen deelprojecten in tijd overlappen en is er veel samenwerking tussen de betrokken onderzoekers.

[redacted] en de [redacted] onderzoekers hebben [redacted] ervaring met translationeel onderzoek naar neuroprotectieve en neuroregeneratieve behandelingenstrategieën voor neonatale hersenschade. Alle modellen en technieken die beschreven zijn in dit project worden [redacted] [redacted] en [redacted] succesvol uitgevoerd. Omdat de beschreven modellen lopend zijn, kunnen de behandelingstrategieën direct getest worden. Daarbij vindt dit onderzoek plaats

in nauwe samenwerking met klinici van de afdeling ██████████ in het ██████████, waardoor de klinische toepasbaarheid van mogelijke therapieën een cruciaal vereiste is voor het testen in de diermodellen.

### 3.3 Belang

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

Wereldwijd ondervinden 1,15 miljoen pasgeboren baby's (8,5 per 1000 levend geboren) een HI insult, wat in 25% leidt tot peri- of postnatale sterfte (jaarlijks 287.000 levend geboren). Van de pasgeboren baby's die het HI insult overleven ontwikkelt 35% permanente neurologische afwijkingen. Jaarlijks betreft dit naar schatting 414.000 pasgeboren baby's. Daarnaast is vroeggeboorte een steeds meer voorkomend probleem in de kliniek; inmiddels wijzen de cijfers uit dat ~10% van alle baby's te vroeg wordt geboren (onder 37 weken gestatie-leeftijd). De verhoogde prevalentie wordt toegeschreven aan drie belangrijke oorzaken; 1) stijging van de gemiddelde leeftijd van de moeder, 2) verhoogde prevalentie van meerlingzwangerschappen door kunstmatige bevruchting, en 3) verhoogde prevalentie van medisch opgewekte vroeggeboorte ter bescherming van de baby (1). Door vooruitgang in de zorg blijven steeds meer (extreem) vroeggeboren kinderen in leven maar de morbiditeit bij deze kinderen blijft onveranderd hoog en 30-50% ontwikkelt milde tot ernstige neurologische problemen.

De hersenschade in zowel voldragen als te vroeg geboren baby's kan zorgen voor levenslange handicaps, cognitieve achterstand, ontwikkeling van epilepsie, gedragsproblematiek (o.a. ADHD), en psychologische en psychiatrische ziektebeelden (autisme en schizofrenie zijn gelinkt met o.a. vroeggeboorte) (2). Daarom heeft neonatale hersenschade aanzienlijke psychosociale en economische consequenties voor de patiënten, hun familie en de maatschappij. Bescherming van het kwetsbare pasgeboren brein en behandeling van neonatale hersenschade is wereldwijd van groot belang, zodat de kwaliteit van leven van de patiëntjes verbeterd wordt. Om bescherming te bewerkstelligen, is het essentieel om de complexe interacties tussen de verschillende pathofysiologische mechanismen in kaart te brengen die betrokken zijn bij het ontstaan van neonatale hersenschade en de daaruit voortkomende afwijkingen in functioneren. Nieuwe inzichten kunnen leiden tot ontwikkeling van nieuwe therapeutische strategieën. Het ontwikkelen van nieuwe en effectieve behandelingen zal leiden tot permanente verbetering van de kwaliteit van leven voor de patiënt, diens omgeving, gezin en de maatschappij.

1. Denney et al. 2008 Womens Health
2. Mwaniki et al. 2012 Lancet

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

#### **Algemene projectstrategie**

De hoofddoelstelling van deze gehele projectaanvraag is het identificeren en testen van mogelijke neuroprotectieve en neuroregeneratieve therapeutische interventies voor neonatale hersenschade in klinisch relevante diermodellen voor de drie patiënten-doelgroepen die we hierboven hebben gedefinieerd, t.w. 1) voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie, 2) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies, en 3) te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies.

De algemene projectstrategie van dit projectvoorstel is dan ook het testen van verschillende neuroprotectieve en neuroregeneratieve therapeutische interventies in de relevante diermodellen voor de bovengenoemde drie vormen van neonatale hersenschade. Bij elk dierexperiment dat uitgevoerd wordt zullen de volgende stappen gevolgd worden.

#### **STAP 1: In vitro experimenten**

Waar mogelijk zullen voorafgaand aan de dierproeven zoveel mogelijk vragen beantwoord worden met



behelp van *in vitro* experimenten met neuronale of gliale cellen. De neuronale cellen kunnen cellijnen zijn, of deze kunnen tezamen met gliale cellen (oligodendrocyten, astrocyten en microglia) in grote aantallen geïsoleerd worden uit de hersenen van dieren uit bijlage III en opgekweekt per celtype. Deze celculturen kunnen blootgesteld worden aan potentiële therapeutische stoffen waarna onderzocht kan worden wat het effect is op bijvoorbeeld celdood, celdifferentiatie of inflammatie.

### **STAP 2: Keuze van het meest relevante diermodel**

Wanneer *in vitro* experimenten hebben uitgewezen dat een bepaalde stof mogelijk als therapie zou kunnen dienen ter behandeling van neonatale hersenschade, is het van belang dit te testen in een van de drie relevante diermodellen. Een diermodel wordt alleen relevant geacht wanneer de beoogde patiëntenpopulatie (doelgroep) in theorie baat zou hebben bij de betreffende behandeling.

In **diermodel 1**, een model voor voldragen baby's met acute asfyxie (doelgroep 1), zijn zowel neuroprotectieve als neuroregeneratieve behandelstrategieën relevant: de hersenen kunnen direct na het insult beschermd worden tegen celdood en inflammatie, en de chronische laesie die ontstaat kan vervolgens mogelijk verkleind worden door therapieën die zich richten op inductie van herstel, zoals stamceltherapie.

**Diermodel 2** is een model voor te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *met* focale laesies (doelgroep 2). Omdat deze pathologie gekarakteriseerd wordt door focale laesies die zich in verloop van dagen/weken in de witte stof ontwikkelen, is het met name relevant om in dit model behandelstrategieën gericht op celtherapie te onderzoeken. De focus binnen dit model ligt dan ook op het geven van stamcellen en groeifactoren die endogene cellen aanzetten tot herstel van de focale laesies.

**Diermodel 3** is een model voor te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en maternale infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte stof schade *zonder* focale laesies (doelgroep 3). Omdat de witte stof schade diffuus is en er geen focale laesies te herstellen zijn, zullen behandelstrategieën niet gericht worden op celtherapie, maar op het remmen van OGD celdood en neuroinflammatie.

De keuze voor de juiste patiëntenpopulatie en bijbehorende relevante diermodellen is reeds in overleg met neonatologen vastgesteld en weergegeven in de tabel van 3.4.2. De experimentele opzet van elk diermodel wordt tevens verder uitgelegd in 3.4.2.

### **STAP 3: Keuze van toedieningsvormen van therapeutische interventies**

De toedieningsvorm is afhankelijk van de therapeutische interventie en aard van de onderzoeksvraag.

| <b>Deelproject</b> | <b>Therapie</b>                                  | <b>Mogelijke toedieningsvormen</b>   |
|--------------------|--|--|
| 1A<br>1B           | P53/JNK remmers<br>TNFα [redacted]<br>[redacted] | Een van de volgende:<br>- intra-peritoneaal<br>- intra-craniaal<br>- subcutaan |
| 2A<br>2B           | Stamcellen<br>Groeifactoren                      | Een van de volgende:<br>- intra-nasaal<br>- intra-craniaal                     |
| 2A i               | Hypothermie                                      | - lichaamstemp verlagen tot 32°C   |
| 2C                 | [redacted]                                       | [redacted]<br>[redacted]<br>[redacted]   |

#### Deelprojecten 1A en 1B:

Eiwitten die betrokken zijn bij de P53/JNK cascade of bij inflammatie (TNFα, [redacted]) kunnen gemoduleerd worden d.m.v injectie van molecuul/peptideremmers die ingrijpen op deze

cascades.

In principe wordt gekozen voor een klinisch toepasbare toedieningsvorm, te weten intra-peritoneaal of subcutaan, tenzij het bekend is dat deze stoffen niet in staat zijn de bloed-brein barrière te passeren. In dat geval wordt gekozen voor intra-craniale injectie.

#### Deelprojecten 2A en 2B:

Stamcellen kunnen intra-nasaal of intra-craniaal worden toegediend, afhankelijk van de onderzoeksvraag en de soort stamcellen. Intra-craniale toediening zal worden gebruikt wanneer we een fundamentele vraag willen beantwoorden. Een voorbeeld uit deelproject is 2A.iv is: Wordt migratie van stamcellen beïnvloed als we [REDACTED] factor x verhoogd tot expressie brengen? In dit voorbeeld zal dus worden gekozen voor lokale intra-craniale toediening van factor x.

Intra-nasale toediening zal worden gebruikt wanneer we de therapeutische eigenschappen van een groeifactor of stamcel willen onderzoeken of de nasale route willen ontrafelen van stamcellen naar plaats van schade.

In de experimenten onder 2A waarin stamceltherapie toegepast wordt, zullen uit beenmerg-afkomstige muizen mesenchymale stamcellen gebruikt worden tenzij anders aangegeven. Deze beenmerg-stamcellen worden aangeschaft via Invitrogen, zijn volledig gekarakteriseerd, zullen onder strikte protocollen steriel gekweekt en gepasseerd worden (maximaal passage 6) tot aan de behandeling in de dieren.

Een uitzondering is bv deelproject 2A iii, waarin we naar de potentie van stamcellen uit verschillende [REDACTED] willen kijken, o.a. [REDACTED]-stamcellen (afkomstig van farmaceut) en [REDACTED] stamcellen (R&D). Ook deze cellen zijn volledig gekarakteriseerd en zullen onder vergelijkbare strikte protocollen steriel gekweekt en gepasseerd worden.

In deelproject 2A iii, zal ook getracht worden de potentie van stamceltherapie te vergroten door de stamcellen voorafgaand aan de toediening te preconditioneren, bv door blootstelling aan een [REDACTED] kweekomgeving of door middel van [REDACTED] [REDACTED]. Voor deze laatstgenoemde experimenten zullen muizen beenmerg-stamcellen gebruikt worden.

Indien we geïnteresseerd zijn in het effect van stamceltherapie of groeifactoren op de proliferatie van endogene stamcellen in de hersenen, zal d.m.v. intra-peritoneale BrdU injecties (max 10) gekeken worden naar celdeling in het brein.

Hypothermie zal worden toegepast in experimenten die worden uitgevoerd onder doelstelling 2A.i. Hierbij worden pups blootgesteld aan een omgevingstemperatuur die zorgt voor een constante lichaamstemperatuur van 32-35°C gedurende max. 4 uur.

#### Deelproject 2C

[REDACTED]

#### **STAP 4: Keuze van uitleesparameters**

##### Primaire uitkomstparameters en einde van het experiment

De primaire uitkomstparameters volgen uit 1) gedragsexperimenten zonder bijkomend ongerief (o.a. voor cognitie en motoriek), en 2) anatomische/histologische en 3) biochemische analyses van de hersenen voor het bepalen van de mate van hersenschade. Afhankelijk van de onderzoeksvraag worden dieren op een tijdstip tussen de 0 dagen en 4 maanden opgeofferd middels een overdosis pentobarbital voor verdere analyse van weefsels.

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

#### **Toepassing van de verschillende diermodellen**

In de onderstaande tabel is kort per doelstelling weergegeven welk diermodel wordt gebruikt. In de tekst

daaronder en in **figuur 2** wordt per diersmodel de experimentele opzet uitgelegd.

| Deelproject | Doelstelling  | Doelgroep | Diersmodel |
|-------------|---|-----------|------------|
| 1A          | i. meest effectieve eiwitremmer ██████████          | 1         | 1          |
|             | ii. remming ██████████ bij witte stof schade        | 3         | 3          |
| 1B          | i. aangrijpen op ██████████                         | 1 en 3    | 1 en 3     |
|             | ii. remmen van inflammatie met ██████████           | 1 en 3    | 1 en 3     |
| 2A          | i. stamceltherapie na koelen                        | 1         | 1          |
|             | ii. stamceltherapie bij witte stof hersenschade     | 2         | 2          |
|             | iii. optimalisatie van stamcellen                   | 1 en 2    | 1 en 2     |
|             | iv. nasale route ontrafelen                         | 1         | 1          |
| 2B          | i. groeifactoren voor herstel van witte stof schade | 2         | 2          |
| 2C          | i. ██████████                                       | 1         | 1          |
|             | ii. ██████████                                      | 1         | 1          |

Diersmodel 1. Model voor voldragen baby's met acute asfyxie (doelgroep 1)

Wanneer dieren op P7-9 worden blootgesteld aan HI (**Bijlage I**), is de hersenschade vergelijkbaar met hersenschade geïnduceerd door acute asfyxie in voldragen baby's (doelgroep 1). Deze is gekarakteriseerd door neuronale celdood en cysteuzie laesies in de grijze stof van de cortex, hippocampus en thalamus. Dit model wordt zowel in muizen als in ratten uitgevoerd. Het model van HI hersenschade in de rat leidt tot vrij forse hersenlaesies, terwijl de hersenschade in de muis tot mildere/kleinere laesies leidt. Afhankelijk van de vraagstelling, de patiëntgroep en de beoogde mate van effect van de therapie of de verkrijgbaarheid van allogene cellen (bv muizen stamcellen) zal voor ofwel het muis- ofwel het rat-model gekozen worden om resp. milde ofwel ernstige hersenschade als gevolg van acute asfyxie na te bootsen.

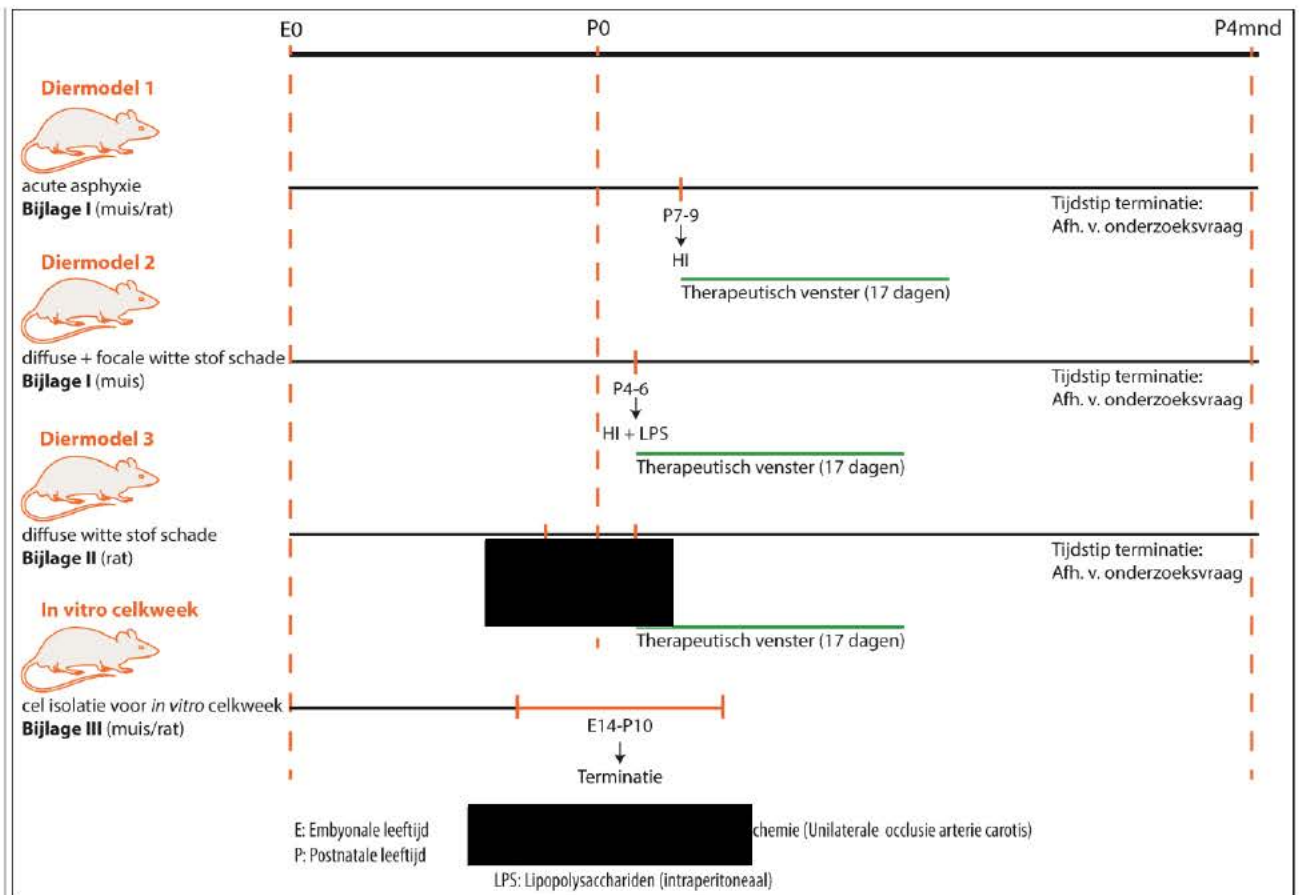
Diersmodel 2. Model voor te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof schade met focale laesies (doelgroep 2)

Omdat zowel inflammatie als hypoxie belangrijke componenten zijn bij het ontstaan van witte stof hersenschade, hebben we een diersmodel ontwikkeld waarin de muizen worden blootgesteld aan HI+LPS op P4-6 (**Bijlage I**). Dit induceert niet-cysteuzie diffuse witte stof schade met focale laesies, zoals wordt waargenomen in 35% van de te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade (doelgroep 2).

Diersmodel 3. Model voor te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof schade zonder focale laesies (doelgroep 3)

Wanneer dieren ██████████ worden blootgesteld en op ██████████ ondergaan, ontstaat een diffuse vorm van witte stof schade zonder focale laesies, zoals wordt waargenomen in 57 % van de te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade (**Bijlage II**).

Met behulp van primaire celwee kunnen we mechanistische vragen beantwoorden over de complexe interactie tussen verschillende cellen die betrokken zijn bij het ontstaan van hersenschade en kunnen we de effecten van verschillende componenten testen op inflammatoire en apoptotische cascades. Voor deze *in vitro* testen worden neuronen, microglia, oligodendrocyten en astrocyten geïsoleerd uit weefsel van embryonale of neonatale ratten of muizen (**Bijlage III**). Na isolatie van de neurale cellen onderzoeken we in het lab hoe deze cellen reageren op verschillende stimuli (inflammatie-factoren, excitotoxiciteit, oxidatieve stress) en of we processen zoals apoptose, proliferatie, differentiatie, en inflammatie kunnen beïnvloeden door blootstelling aan potentiële therapeutische componenten. Dit wordt gedaan aan de hand van morfologische inspectie, immunofluorescente kleuringen, en bepaling van eiwitconcentraties. Dit *ex vivo* en *in vitro* onderzoek is belangrijk aangezien het nieuwe kennis oplevert over de moleculaire mechanismen die een rol spelen bij het ontstaan van neonatale hersenschade. Deze kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe behandelingen voor witte stof hersenschade in te vroeg geboren baby's, en hersenschade na acute asfyxie in voldragen baby's.



**Figuur 2.** Verschillende type diermodellen zoals beschreven in de verschillende bijlagen.

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.

### Strategie per deelproject

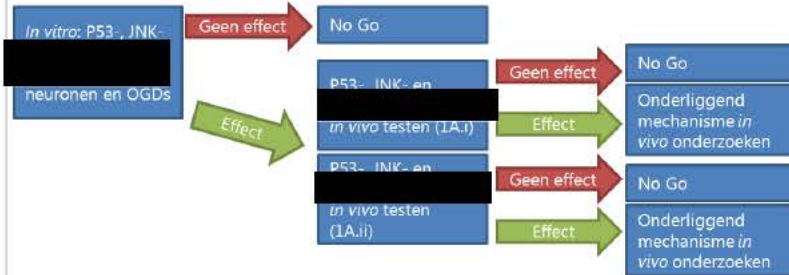
In de onderstaande tekst en figuren is de strategie per deelproject uitgewerkt. Om te bepalen of een behandeling *in vivo* een effect heeft, wordt als primaire uitkomstparameter bv een motorische gedragstest, een anatomische analyse of biochemische analyse op de hersenen uitgevoerd. Wanneer op deze uitkomstparameter(s) geen significant verschil wordt gevonden ten opzichte van de vehicle behandelde groep, definiëren we dat als "geen effect".

### Deelproject 1A. Remmen van neuronale en OGD celdood

In dit deelproject zullen er allereerst *in vitro* experimenten uitgevoerd worden op zoek naar effectieve molecuul-/peptideremmers [redacted] de P53 en JNK cascades in neuronen en OGDs. De remmers zullen *in vivo* worden getest op het beschermen tegen neuronale schade na HI (diermodel 1). Wanneer er geen effect wordt gevonden zal er gestopt worden met het testen van deze remmer. Wanneer er *in vitro* een effect wordt gevonden, worden er meerdere outcome experimenten uitgevoerd (zie figuur 3) om de effecten van de remmers in kaart te brengen op meerdere parameters (bv vrije radicaal vorming (vroeg biochemie), gedrag (lange termijn) en celdood (histologie)). Met de informatie uit de *in vitro* experimenten met OGDs zal tevens onderzocht worden of remmers van [redacted] P53 en JNK ook bijdragen aan het voorkomen van witte stof hersenschade (diermodel 3).



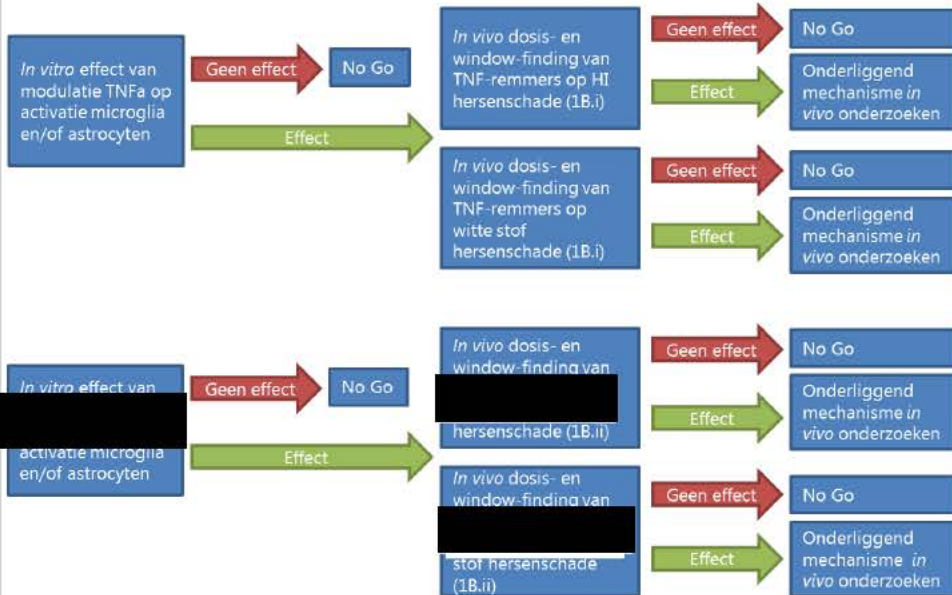
**Hypothese:** Het remmen van de JNK en p53 cascades remt apoptotische celdood in neuronen en OGD en draagt zo bij aan het verminderen van hersenschade na acute asfyxie, dan wel witte stof schade



### Deelproject 1B. Remmen van inflammatie

In dit deelproject zullen er allereerst *in vitro* experimenten uitgevoerd worden om het effect van modulatie van TNFa (deelproject 1B.i) dan wel [redacted] receptoren (deelproject 1B.ii) te bepalen. Indien er geen effect wordt gevonden, zullen de *in vivo* experimenten niet worden uitgevoerd. Indien er wel een effect wordt gevonden, worden *in vivo* dose/window experimenten uitgevoerd en wordt er met de optimale dosis/window het effect op HI hersenschade (diermodel 1) en witte stof hersenschade (diermodel 3) bepaald. Mocht de behandeling bijdragen aan herstel van hersenschade, dan wordt verder onderzoek verricht naar het onderliggende mechanisme op verschillende outcome parameters.

**Hypothese:** Het remmen van neuroinflammatie ofwel door het afremmen van pro-inflammatie (TNFa) ofwel door het stimuleren van anti-inflammatie [redacted] vermindert hersenschade na acute asfyxie, dan wel witte stof hersenschade



### Deelproject 2A. Aanmaak van nieuw neurale weefsel (m.b.v. stamceltherapie)

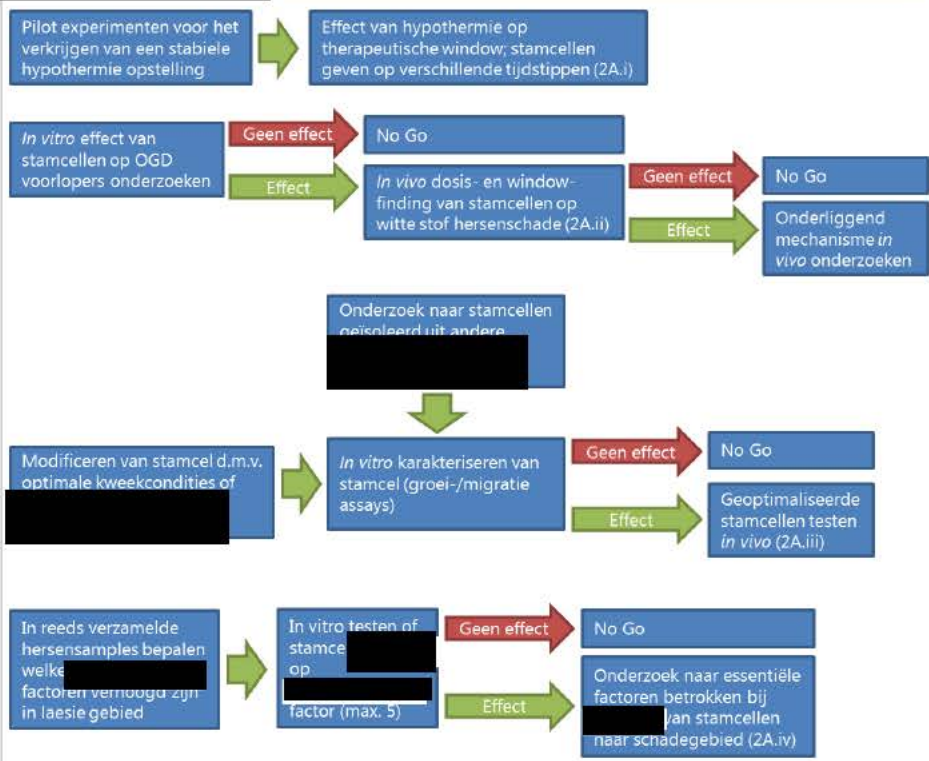
In deelproject 2A.i. worden eerst pilot experimenten uitgevoerd voor het opzetten van een stabiele hypothermie opstelling. Daarna wordt onderzocht wat het effect is van hypothermie op het therapeutische window van stamceltherapie in hersenschade na HI (diermodel 1).

In deel project 2A.ii. wordt eerst *in vitro* getest of de stamcel effect heeft op oligodendrocyte uitrijping. Indien er een effect wordt gevonden, wordt *in vivo* onderzoek gedaan naar de dosis en window van stamceltherapie bij witte stof hersenschade (diermodel 2).

In deelproject 2A.iii. wordt eerst *in vitro* de stamcel gemodificeerd en het effect op groei of migratie gekarakteriseerd. Indien er een effect wordt gevonden, wordt vervolgens *in vivo* onderzoek gedaan naar de potentie van de stamcel bij het herstel van HI (diermodel 1) dan wel witte stof hersenschade (diermodel 2).

In deelproject 2A.iv. wordt eerst in eerder verzameld hersenweefsel bepaald welke factoren verhoogd aanwezig zijn in het laesiegebied. Vervolgens wordt *in vitro* getest of stamcellen migreren op deze (max 5). In dit het geval is, zal *in vivo* onderzoek worden gedaan naar de die betrokken zijn bij van stamcellen naar het schadegebied (diermodel 1).

**Hypothese:**



**Deelproject 2B. Stimuleren van celgroei (m.b.v. groeifactoren)**

Allereerst zal *in vitro* het effect van groeifactoren (GF) worden bepaald op OGD maturatie. Indien een effect wordt gevonden, worden *in vivo* dose/window experimenten uitgevoerd en wordt er met de optimale dosis/window onderzocht of deze GF bij kan dragen aan het herstellen van witte stof hersenschade (diermodel 2). Indien er een effect wordt gevonden, worden vervolgens combinaties van de meest potente groeifactoren *in vivo* getest.

**Hypothese:**



**Deelproject 2C:**

Hypothese:

De bovenstaande deelprojecten worden uitgevoerd door verschillende AIO's, biotechnici en postdoctoraal onderzoekers binnen de onderzoeksgroep. Dit geeft de gelegenheid om de deelprojecten in parallel uit te voeren. De verworven resultaten per deelproject zullen het startmoment van de andere deelprojecten niet beïnvloeden, waardoor deze in tijd zullen overlappen.

#### **Dierproefoverzicht**

In figuur 3 staat een volledig overzicht van alle uit te voeren dierproeven per deelproject en bijbehorend diermodel. Hierin staat tevens of dosis en/of therapeutisch window bekend is van de betreffende teststof, of dat dosis- en/of therapeutisch window-experimenten nog worden uitgevoerd.

| Deelproject | Omschrijving                | Dosis bekend?                  | model 1 | model 2 | model 3 | Window bekend?                                | model 1 | model 2 | model 3 | Outcome experiment (met optimale dosis en window) | model 1 | model 2 | model 3 |     |
|-------------|-----------------------------|--------------------------------|---------|---------|---------|---|---------|---------|---------|---|---------|---------|---------|-----|
|             |                             |                                | muus    | rat     | muus    |   | muus    | rat     | muus    | opofferingsmomenten                               | muus    | rat     | muus    | rat |
| 1A          | JNK remmend peptide         | ja (10 mg/kg)                  |         |         |         | JA; direct na HI schade                       |         |         |         |   |         |         |         |     |
|             | p53 remmend peptide         | ja (8 mg/kg)                   |         |         |         | JA; direct na HI schade                       |         |         |         |   |         |         |         |     |
|             | Interactie JNK-p53 remmer   | ja (10 mg/kg)                  |         |         |         | JA; direct na HI schade                       |         |         |         |   |         |         |         |     |
|             |                             |                                |         |         |         |   |         |         |         |   |         |         |         |     |
| 1B          |                             | <b>dosis respons uitvoeren</b> | 1x      | 1x      | 1x      | <b>theapeutisch window uitvoeren (0-72u)</b>  | 1x      | 1x      | 1x      |   |         |         |         |     |
|             |                             | <b>dosis respons uitvoeren</b> | 1x      | 1x      | 1x      | <b>theapeutisch window uitvoeren (0-72u)</b>  | 1x      | 1x      | 1x      | <b>2</b>  |         |         |         |     |
|             | TNF-remmer (etanercept)     | ja (5 mg/kg)                   |         |         |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (0-72u)</b>  | 1x      | 1x      | 1x      |   |         |         |         |     |
|             |                             | <b>dosis respons uitvoeren</b> | 1x      |         | 1x      | <b>theapeutisch window uitvoeren (0-72u)</b>  | 1x      |         | 1x      |   |         |         |         |     |
|             |                             | ja (50 ng)                     |         |         |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (0-72u)</b>  | 1x      |         | 1x      | <b>3</b>  |         |         |         |     |
|             |                             | ja (50 ng)                     |         |         |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (0-72u)</b>  | 1x      |         | 1x      |   |         |         |         |     |
| 2A          |                             |                                |         |         |         |   |         |         |         |   |         |         |         |     |
| I.          | stamcellen+hypothemie       | ja (0.5-2.0 x10E6 c)           |         |         |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)</b> | 1x      |         |         | <b>2</b>  |         |         |         |     |
| II.         | stamcellen-witte stofschade | <b>dosis respons uitvoeren</b> |         | 1x      |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)</b> | 1x      |         | 1x      | <b>2</b>  |         |         |         |     |
| III.        | stamcel source              | <b>dosis respons uitvoeren</b> | 2x      | 1x      |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)</b> | 1x      |         | 1x      | <b>1</b>  |         |         |         |     |
| III.        | stamcellen                  | ja                             |         |         |         | JA; tot 10 dagen                              |         |         |         | <b>2</b>  |         |         |         |     |
| III.        | stamcellen                  | ja                             |         |         |         | JA; tot 10 dagen                              |         |         |         | <b>2</b>  |         |         |         |     |
| IV.         | stamcellen route            | ja (0.5-2.0x10E6 c)            |         |         |         | JA; tot 10 dagen                              |         |         |         | <b>3</b>  |         |         |         |     |
| 2B          |                             | <b>dosis respons uitvoeren</b> |         | 3x      |         | <b>theapeutisch window uitvoeren (1-10 d)</b> |         |         | 1x      | <b>3</b>  |         |         |         |     |
|             |                             | (literatuur: 10-200 ng)        |         |         |         |   |         |         |         |   |         |         |         |     |
| 2C          |                             | <b>dosis respons uitvoeren</b> | 1x      |         |         | <b>theapeutisch window uitvoeren</b>          | 1x      |         |         | <b>2</b>  |         |         |         |     |
|             |                             | <b>dosis respons uitvoeren</b> | 1x      |         |         | <b>theapeutisch window uitvoeren</b>          | 1x      |         |         | <b>2</b>  |         |         |         |     |

**Figuur 3:** Overzicht van alle uit te voeren dierproeven



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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Hypoxische-ischemische hersenschade in voldragen en te vroeg geboren baby's (doelgroep 1 en 2) |
| 2          | Diffuse witte stof hersenschade zonder focale laesies in te vroeg geboren baby's (doelgroep 3) |
| 3          | Neuronale en gliale cellen voor primaire celkweek  |
| 4          |  |
| 5          |  |
| 6          |  |
| 7          |  |
| 8          |  |
| 9          |  |
| 10         |  |



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Hypoxische-ischemische hersenschade in voldragen en te vroeg geboren baby's (doelgroep 1 en 2) |
- 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.

##### **Experimentele aanpak**

In deze experimenten onderzoeken we mogelijke behandelingen voor het voorkomen of herstellen van hypoxische-ischemische (HI) hersenschade. HI hersenschade wordt geïnduceerd in pasgeboren muizen of ratten middels permanente unilaterale afsluiting van de halsslagader (a. carotis), gevolgd door blootstelling aan systemische hypoxie. [redacted] heeft [redacted] met dit model, dat wereldwijd gebruikt wordt als model voor neonatale hersenschade als gevolg van hypoxische ischemie; het zogenaamde Vannucci-Rice model [redacted]

##### Diermodel 1. Model voor voldragen baby's met acute asfyxie (doelgroep 1)

Wanneer dieren op P7-9 worden blootgesteld aan HI, is de hersenschade vergelijkbaar met hersenschade geïnduceerd door acute asfyxie in voldragen baby's (doelgroep 1). Deze is gekarakteriseerd door neuronale celdood en cysteuze laesies in de grijze stof van de cortex, hippocampus en thalamus. Dit model wordt zowel in muizen als in ratten uitgevoerd. Het model van HI hersenschade in de rat leidt tot vrij forse hersenlaesies, terwijl de hersenschade in de muis tot mildere/kleinere laesies leidt. Afhankelijk van de vraagstelling, de patiëntgroep en de beoogde mate van effect van de therapie of de verkrijgbaarheid van allogene cellen (bv muizen stamcellen) zal voor ofwel het muis- ofwel het rat-model gekozen worden om resp. milde ofwel ernstige hersenschade als gevolg van acute asfyxie na te bootsen.

##### Diermodel 2. Model voor te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof schade met focale laesies (doelgroep 2)

Blootstelling aan HI+LPS op P4-6 in muizen induceert niet-cysteuze diffuse witte stof schade met focale laesies zoals wordt waargenomen in 35% van de te vroeg geboren baby's met witte stof hersenschade

(doelgroep 2).

Omdat bij te vroeg geboren baby's bekend is dat inflammatie een belangrijke risicofactor is voor een slechter ziekteverloop van witte stof hersenschade, nemen wij deze component mee in ons model voor witte stof hersenschade.

### Primaire uitkomstparameters

Primaire uitkomstparameters zijn de scores van gedragstesten (voor het meten van motoriek, cognitie, sociaal-emotioneel gedrag, en/of perifere sensibiliteit) en de mate van hersenschade (bepaald door anatomische analyses zoals histologie of *ex vivo* MRI). Secundaire uitkomstparameters omvatten o.a. concentraties van RNA/eiwitten betrokken bij hersenschade, apoptose, neuroinflammatie, oxidatief metabolisme, neuroregeneratie en neuroprotectie.

### Behandelmethode

Na de inductie van HI hersenschade wordt met verschillende behandelmethoden getracht de mate van hersenschade en de gevolgen op gedrag te verminderen of te herstellen. Deze behandelmethoden zijn onderverdeeld in de volgende deelprojecten:

1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)
  - A. Remmen van celdood
  - B. Remmen van inflammatie
2. Neuroregeneratie (gericht op herstel en heropbouw van neurale weefsel)
  - A. Aanmaak van nieuw weefsel met stamceltherapie
  - B. Stimuleren van celgroei m.b.v. groeifactoren

### Referenties:

- Rice et al. 1981 Ann Neurol
- Nijboer et al. 2011 Ann Neurol
- Donega et al. 2013 PLoS One

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.

C57/BL6 muizen of Wistar ratten worden zonder ongerief in huis gefokt. De nakomelingen ondergaan de volgende **experimentele behandeling**:

#### Inductie van HI hersenschade op postnatale dag P4-P9:

Diermodel 1: P7-9 HI (muis of rat)

Diermodel 2: P4-6 HI + LPS (muis)

- Inhalatieanesthesie (isofluraan, max. 10 min.) in combinatie met lokale pijnstilling (xylocaine bupivacaine)
- Inductie ischemie:  
Permanente unilaterale occlusie van de a. carotis dextra, gevolgd door recovery voor minimaal 60 min in de thuishoel.
- Inductie hypoxie:  
Het dier wordt eenmalig gedurende 30-140 min. blootgesteld aan 6-10% O<sub>2</sub>, 90-94% N<sub>2</sub>.
- Controle groep wordt sham geopereerd (geen occlusie a. carotis dextra), niet blootgesteld aan verlaagd O<sub>2</sub> percentage.
- In diermodel 2 krijgen de dieren aansluitend aan de HI eenmalig een intraperitoneale (i.p.) injectie met LPS (0.5-1.0 mg/kg) of PBS als vehicle (controle groep).

#### Gedragstesten:

De dieren worden onderworpen aan één of een combinatie van de volgende gedragstesten. Keuze van gedragstesten is afhankelijk van wetenschappelijke vraagstelling en de beoogde patiëntenpopulatie voor de behandeling. Alle gedragstesten die gebruikt worden zijn bestaande en geaccepteerde testen om de betreffende gedragingen in knaagdieren te onderzoeken. De testen zijn opgezet in samenwerking met experts op het gebied van gedragsonderzoek (o.a. [redacted]).

- Vroege motorieke ontwikkeling tijdens eerste 3 levensweken (o.a. omdraaireflex, grijpreflex, locomotor

activiteit)

- Motor functie (o.a. cilindertest, rotarod, adhesive removal test)
- Cognitie (o.a. novel object recognition, modified holeboard, T maze)
- Kernsymptomen van autisme en ADHD (o.a. social interaction test, social novelty, repetitief (poets)gedrag, open veld, locomotor activiteit)

#### Behandelmethoden (0 tot 17 dagen na inductie HI hersenschade):

De volgende behandelmethoden zullen in deze modellen worden onderzocht.

##### **Diermodel 1:**

- Eiwitten die aangrijpen op P53/JNK cascade of inflammatie (TNF $\alpha$ , [REDACTED]receptoren) kunnen intra-peritoneaal (i.p), intra-craniaal (i.c.) of subcutaan (s.c.) geïnjecteerd worden. In principe wordt gekozen voor een klinisch toepasbare toedieningsvorm, te weten i.p. of s.c., tenzij het bekend is dat deze stoffen niet in staat zijn de bloed-brein barrière te passeren. In dat geval wordt gekozen voor i.c. injectie. (Deze behandelingen zijn onderdeel van deelprojecten 1A en 1B)

##### **Diermodel 1 en 2:**

- Stamcellen of groeifactoren kunnen intra-nasaal (i.n.) of i.c. worden toegediend, afhankelijk van de onderzoeksvraag en de soort stamcellen. I.c. toediening zal worden gebruikt wanneer we een fundamentele vraag willen beantwoorden. Intra-nasale toediening zal worden gebruikt wanneer we de therapeutische eigenschappen van een groeifactor of stamcel willen onderzoeken of de nasale route willen ontrafelen van stamcellen naar plaats van schade.

I.n. toediening: max. volume 4x 3  $\mu$ l, voorafgegaan door i.n. toediening van hyaluronidase (enzym om neusslijmvlies toegankelijker te maken)

I.c. toediening: max. volume 2  $\mu$ l onder inhalatieanesthesie (isofluraan max. 5-10 min.)

Indien we geïnteresseerd zijn in het effect van stamcellen of groeifactoren op de proliferatie van endogene stamcellen in de hersenen, zal d.m.v. i.p. BrdU injecties (max 10) gekeken worden naar celdeling in het brein.

Hypothermie zal worden toegepast in experimenten die worden uitgevoerd onder doelstelling 2A.i. Hierbij worden pups blootgesteld aan een omgevingstemperatuur die zorgt voor een constante lichaamstemperatuur van 32-35°C gedurende max. 4 uur.

(Deze behandelingen zijn onderdeel van deelprojecten 2A en 2B)

#### Randomisering en blinding

Om nest-effecten tussen groepen te voorkomen, worden binnen in één nest de pups willekeurig verdeeld over de verschillende experimentele groepen. De uitvoerend onderzoeker krijgt geblindeerde oplossingen met behandelstoffen en weet dus niet aan welke stof elke moeder of pup wordt blootgesteld (bijv. in geval van stamcellen, groeifactoren, of remmers).

#### Terminatie (0 dagen tot 4 maanden na inductie HI hersenschade):

Dieren worden gedood door middel van overdosis aan euthasaat. De leeftijd waarop de dieren worden gedood is afhankelijk van de wetenschappelijke vraagstelling.

#### Referenties:

1. Cai et al. 2011 Neurosci
2. Lin et al. 2009 Exp Neurol

---

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

---

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Een negatieve controle groep wordt sham geopereerd (geen hersenschade), een positieve controle groep wordt blootgesteld aan HI schade en vervolgens behandeld met vehicle (wel hersenschade, geen therapeutisch effect). Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de

kwaliteit van het HI model te waarborgen en om als basiswaarden voor de primaire uitkomstparameters te dienen.

De experimenten worden uitgevoerd per behandelmethode en opgesplitst op basis van een specifieke en gerichte deelonderzoeksvraag (zie projectaanvraag). Op deze manier is het experiment praktisch uitvoerbaar en is de statistische analyse niet te complex. De deelonderzoeksvraag bepaalt dan ook de statistische analyse (bijvoorbeeld één- of twee-weg ANOVAs met post-hoc test).

De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de meest relevante parameter en een daarbij passende powerberekening. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de uitkomst van een gedragstest of de mate van hersenschade (bijvoorbeeld laesie grootte). Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen met een power van 90% en een alfa van 5%. In deze powerberekening wordt gecorrigeerd voor het aantal vergelijkingen middels de Bonferroni correctie. In geval van een twee-weg ANOVA wordt bij de steekproefberekening tevens rekening gehouden met een mogelijk interactie effect.

## **B. De dieren**

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

Deze experimenten worden zowel in muizen als in ratten uitgevoerd. Deze keuze van diersoort is afhankelijk van de experimentele vraagstelling en beoogde behandeling. [REDACTED] 3 modellen voor hypoxisch-ischemische hersenschade [REDACTED]: (1) het model van HI hersenschade voor de voldragen pasgeborene in de rat leidt tot vrij forse hersenlaesies die zich uitspreiden in hippocampus, cortex en striatum (diermodel 1), terwijl (2) de HI hersenschade voor de voldragen pasgeborene in de muis tot mildere/kleinere laesies leidt in voornamelijk de hippocampus (diermodel 1). (3) De HI hersenschade van het muismodel voor de te vroeg geboren baby (HI wordt vroeger geïnduceerd; tussen P4 en P6) leidt tot diffuse witte stof schade met focale laesies (diermodel 2). In de projectaanvraag is per onderzoeksvraag weergegeven wanneer voor welk model wordt gekozen.

Er is gekozen voor Wistar ratten en C57/BL6 muizen. Beide stammen worden wereldwijd gebruikt als model voor het onderzoeken van neonatale hypoxisch-ischemische hersenschade rondom de geboorte in humane pasgeborenen (d.m.v. het Vannucci-Rice model). [REDACTED] met deze modellen. Beiden diersoorten worden in huis gefokt, om maternale stress tijdens transport te voorkomen.

We zijn ons bewust van het feit dat een outbred rat en een inbred muis wordt gebruikt. Het Vannucci-Rice model is opgezet in de Wistar rat en de C57/BL6 muis, en dit model wordt in de literatuur dan ook voornamelijk gebruikt in deze stammen. Omdat we het belangrijk vinden dat onze resultaten vergelijkbaar zijn met de resultaten uit de literatuur, hebben we besloten voor deze experimenten de Wistar rat en de C57/BL6 muis te gebruiken.

Er is geen voorkeur voor geslacht, zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen worden gebruikt in de experimenten.

### **Geschatte aantallen:**

Het geschatte aantal dieren per experiment is afhankelijk van het type experiment. Er zullen 3 type experimenten worden uitgevoerd:

1. Dosis-respons experiment: voor het bepalen van de meest effectieve dosis van een stof; er zullen 3 doses getest worden.
2. Therapeutisch window experiment: voor het bepalen binnen welk tijdsvenster een stof effectief is (en dus wat een optimaal behandelstip is); er zullen 3 tijdstippen getest worden.
3. Outcome experiment: voor het vergelijken van de effectiviteit van verschillende stoffen op verschillende uitkomstparameters of tijdstippen

De grootte van het gevonden relatieve effect tussen de groepen zal bij een dosis response en een therapeutisch window experiment kleiner zijn ( $\pm 13\%$ ) dan bij een outcome experiment ( $\pm 16\%$ ) waarbij de

optimale dosis en/of window gebruikt worden.

In de experimenten voor HI hersenschade (doelgroep 1/model 1) observeren we doorgaans een variatie van 10%. Gebruik makend van een ANOVA met Bonferroni correctie op een alfa van 5%, en met een power van 90%, betekent dit dat een groepsgrootte van 18 dieren nodig is voor een dosis-respons of therapeutisch window experiment en een groepsgrootte van 12 dieren voor een outcome experiment.

Dit betekent dat we per experiment het volgende aantal dieren nodig hebben:

| <b>Opzet dosis-respons experiment</b> |                |                    |                   |               |
|---------------------------------------|----------------|--------------------|-------------------|---------------|
| <b>Exp groep</b>                      | <b>Groepen</b> | <b>Behandeling</b> | <b>Dosis</b>      | <b>Aantal</b> |
| 1                                     | SHAM           |                    |                   | n=18          |
| 2                                     | hersenschade   | VEHICLE            | hoogst equivalent | n=18          |
| 3                                     | hersenschade   | experimentele stof | dosis 1           | n=18          |
| 4                                     | hersenschade   | experimentele stof | dosis 2           | n=18          |
| 5                                     | hersenschade   | experimentele stof | dosis 3           | n=18          |
| Totaal aantal dieren:                 |                |                    |                   | 90            |

| <b>Opzet therapeutisch window experiment</b> |                |                    |                       |               |
|--|----------------|--------------------|-----------------------|---------------|
| <b>Exp groep</b>                             | <b>Groepen</b> | <b>Behandeling</b> | <b>Start tijdstip</b> | <b>Aantal</b> |
| 1  | SHAM           |                    |                       | n=18          |
| 2  | hersenschade   | VEHICLE            | tijdstip 1            | n=18          |
| 3  | hersenschade   | experimentele stof | tijdstip 1            | n=18          |
| 4  | hersenschade   | experimentele stof | tijdstip 2            | n=18          |
| 5  | hersenschade   | experimentele stof | tijdstip 3            | n=18          |
| Totaal aantal dieren:                        |                |                    |                       | 90            |

| <b>Opzet outcome experiment</b> |                |                         |               |
|---------------------------------|----------------|-------------------------|---------------|
| <b>Exp groep</b>                | <b>Groepen</b> | <b>Behandeling</b>      | <b>Aantal</b> |
| 1                               | SHAM           |                         | n=12          |
| 2                               | hersenschade   | VEHICLE                 | n=12          |
| 3                               | hersenschade   | bv experimentele stof 1 | n=12          |
| 4                               | hersenschade   | bv experimentele stof 2 | n=12          |
| 5                               | hersenschade   | bv experimentele stof 3 | n=12          |
| Totaal aantal dieren:           |                |                         | 60            |

**Het te verwachten maximaal aantal dierproeven en proefdieren per deelproject:**

Een uitgebreid overzicht van alle uit te voeren dierproeven is weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. Tevens is weergegeven in deze tabel of dosis en/of therapeutisch window al bekend is of nog onderzocht dient te worden.

Hieronder is een beknopt overzicht weergegeven van het aantal dieren per deelproject.

NB: Het te verwachten aantal dierproeven is het mogelijk maximale aantal en is daarom gebaseerd op positieve resultaten. Indien een negatief resultaat gevonden wordt op een GO/NO GO moment, zal uiteraard een NO GO ingezet worden. Wanneer een NO GO wordt bereikt zal het totaal aantal dieren dus lager uitvallen.

| Deelproject                  | Diermodel | Soort experiment | Aantal experimenten | Aantal muis | Aantal rat |
|------------------------------|-----------|------------------|---------------------|-------------|------------|
| 1A                           | 1 (Rat)   | Outcome          | 3                   |             | 180        |
| 1B                           | 1 (Muis)  | Dosis respons    | 3                   | 270         |            |
|                              |           | Therap. window   | 6                   | 540         |            |
|                              |           | Outcome          | 5                   | 300         |            |
|                              | 1 (Rat)   | Dosis respons    | 2                   |             | 180        |
|                              |           | Therap. window   | 3                   |             | 270        |
|                              |           | Outcome          | 2                   |             | 120        |
| 2A                           | 1 (Muis)  | Dosis respons    | 2                   | 180         |            |
|                              |           | Therap. window   | 2                   | 180         |            |
|                              |           | Outcome          | 10                  | 600         |            |
|                              | 2 (Muis)  | Dosis respons    | 2                   | 180         |            |
|                              |           | Therap. window   | 2                   | 180         |            |
|                              |           | Outcome          | 7                   | 420         |            |
| 2B                           | 2 (Muis)  | Dosis respons    | 3                   | 270         |            |
|                              |           | Therap. window   | 1                   | 90          |            |
|                              |           | Outcome          | 3                   | 180         |            |
| 2C                           | 1 (Muis)  | Dosis respons    | 2                   | 180         |            |
|                              |           | Therap. window   | 2                   | 180         |            |
|                              |           | Outcome          | 4                   | 240         |            |
| <b>Totaal aantal dieren:</b> |           |                  |                     | <b>3990</b> | <b>750</b> |

#### Totaal aantal moeders

Voor het verkrijgen van 3990 muizen zullen bij een nestgrootte van 6 pups/nest 665 zogende moeders nodig zijn. Aangezien 10% van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, vragen wij 67 extra muizen moeders aan. Dit maakt een totaal van **732 zogende muizenmoeders**.

Voor het verkrijgen van 750 ratten zullen bij een nestgrootte van 8 pups/nest 94 zogende moeders nodig zijn. Aangezien 10% van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, vragen wij 10 extra ratten moeders aan. Dit maakt een totaal van **104 zogende rattenmoeders**.

#### 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.

Indien beschikbaar hergebruiken we fokmoeders die eerder binnen deze projectaanvraag gebruikt zijn voor fok (zoals vermeld onder sectie B van bijlage I en III) en niet behandeld zijn in dat experiment.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met inachtneming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

#### Vervanging

Het model voor HI geïnduceerde hersenschade is ontworpen om de ontwikkeling en behandeling van neonatale hersenschade te kunnen onderzoeken. Vanwege de complexe pathofysiologie van hersenschade en de grote bijdrage van andere orgaansystemen (o.a. het immuunsysteem en de bloed-hersenbarrière), is het niet mogelijk om dit gehele systeem *in vitro* na te bootsen. Daarnaast is gedrag een belangrijke

functionele uitkomstparameter, wat alleen in het levende dier gemeten kan worden.

Indien mogelijk wordt voorafgaand aan een dierexperiment de effectiviteit van een behandelmethode *in vitro* getest met behulp van neuronale of gliale celculturen. Tevens dienen deze *in vitro* systemen voor het identificeren van moleculaire en cellulaire cascades die betrokken zijn bij neuroprotectie en neuroregeneratie.

#### Vermindering

Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de correcte vergelijkingen maken voor het aannemen of verwerpen van onze hypothese, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening (zie uitleg punt A). Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. Verder zullen zoveel mogelijk gedragsmetingen sequentieel in dezelfde dieren worden gemeten en waar mogelijk *ex vivo* MRI experimenten met histologische metingen gecombineerd worden.

Vermindering wordt ook bewerkstelligd door het inbouwen van Go/No Go keuzemomenten, zoals weergegeven in de strategie van de projectaanvraag. Hierdoor kunnen onnodige experimenten met grote groepen vermeden worden.

#### Verfijning

Aantasting van het welzijn wordt zoveel mogelijk beperkt doordat de handelingen worden uitgevoerd door of onder leiding van onderzoekers en biotechnici die al jaren ervaring hebben met dit model en de handeling zo efficiënt mogelijk kunnen uitvoeren. Daardoor worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder. Om stress te voorkomen bij de moeder, blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zwangere en zogende moeders extra tissues met kartonnen huisje of doorloop in de kooi om een nest te bouwen en zich te verschuilen.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

De dieren worden in groepen gehuisvest.

Tijdens de experimentele handelingen (coagulatie a. carotis) wordt pijnbestrijding toegepast. De eerste dagen na HI inductie worden die dieren geïnspecteerd op onvoldoende drinken, groeiachterstand of immobiliteit. Wanneer een dier onverwacht ernstig ongerief ondervindt en/of een vooraf bepaalde grens bereikt in groeiachterstand of gedragsverandering, wordt besloten het dier te doden. Uit de jarenlange ervaring met dit model is gebleken dat dit in 2-3% van de dieren nodig was.

## **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.

Geen wettelijk vereist onderzoek, dus n.v.t.

## **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.

De zwangere moeders worden in afwachting van hun bevalling enkele dagen solitair gehuisvest omdat de exacte geboortedatum van de pups moet worden vastgesteld. Standaard wordt er een shelter en tissues geplaatst in de kooi. Afhankelijk van de vraagstelling wordt extra kooiverrijking (bv. iglo met looprad) toegevoegd aan de kooi.

#### **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 > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

Om pijn tijdens de operatie (occlusie van de a. carotis dextra) te voorkomen wordt de operatie uitgevoerd onder inhalatie anesthesie met isofluraan.

Operatie wordt gestart wanneer pijnreflex afwezig is. De mate van verdoving wordt tijdens de operatie in de gaten gehouden door testen van pijnreflex en het ritme van ademhaling.

Mogelijk ondervinden de dieren pijn als gevolg van de operatie. Daarom wordt peri- en postoperatief xylocaine lokaal aangebracht op de incisie/wond.

#### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Stress

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Stress kan ontstaan ten gevolge van het verstoren van de nesten en het oppakken van de dieren.

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

Om stress bij moeder en pups zo laag mogelijk te houden, worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder en blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zogende moeders ter beschutting van het nest extra tissues met kartonnen huisje (of mogelijk extra

kooiverrijking) in de kooi.

Om stress ten gevolge van oppakken te verkleinen, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

#### 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.

Incidenteel zal er een pup gedurende de eerste twee dagen na de operatie teveel achterblijven in groei of niet genoeg drinken. Dit wordt waargenomen door respectievelijk een ingevallen buik of geen melk zichtbaar in de maag van de pup. Wanneer dit geobserveerd wordt, zal het dier worden gedood. De dieren worden de eerste 48h 1x per dag door de onderzoeker gecontroleerd. Bij experimenten waarbij de dieren >een week in leven blijven, worden de dieren wekelijks gewogen, bij achterblijven in groei en/of gewichtsafname van >20% zal het dier worden gedood.

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

Uit eerdere experimenten wordt geschat dat 2-3% van de dieren kans loopt deze criteria te halen.

#### 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.

Experimentele pups die sham-geopereerd worden ( $\pm 20\%$ ): Licht

Experimentele pups die occlusie van de a. carotis dextra en hypoxia ondergaan ( $\pm 80\%$ ): Matig

Zogende moeders: licht ongerief wegens verstoren van de nesten

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De nakomelingen worden na afloop van het experiment gedood vanwege de noodzaak om weefsels te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium. Omdat de mate van hersenschade een belangrijke uitkomstparameter is, is het doden van het dier als eindpunt voor dit experiment noodzakelijk, zodat analyses kunnen worden uitgevoerd op de hersenen.

Indien de moeders (zoals vermeld in sectie B) niet behandeld zijn, kunnen deze hergebruikt worden als fokmoeder voor volgende experimenten binnen deze projectaanvraag.

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

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. 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 het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 2          | Diffuse witte stof hersenschade zonder focale laesies in te vroeg geboren baby's (doelgroep 3) |
- 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.

##### Experimentele aanpak

In deze experimenten onderzoeken we mogelijke behandelingen voor het voorkomen of herstellen van diffuse witte stof hersenschade bij te vroeg geboren neonaten. In tegenstelling tot voldragen baby's, komt hersenschade in te vroeg geboren baby's voornamelijk voor in de witte stof (1). Inflammatie tijdens de zwangerschap is een belangrijke oorzaak van vroeggeboorte. Vervolgens kunnen de onrijpe longen van te vroeg geboren baby's leiden tot ademhalingsproblemen en zuurstoftekort. In de literatuur is bekend dat de te vroeg geboren baby's die zowel maternale inflammatie als postnatale zuurstoftekort ondervonden het meest vatbaar zijn voor diffuse witte stof schade (1, 2). Dit staat bekend als het zgn. multiple-hit model van premature witte stof schade. In dit diertype (diertype 3) wordt het ontstaan van diffuse witte stof hersenschade nagebootst door ratten [redacted] bloot te stellen aan [redacted] en [redacted] aan [redacted]. De combinatie van deze blootstellingen veroorzaakt microglia en astrocyt activatie, oligodendrocyt maturatie-arrest, en een verstoorde ontwikkeling van witte stof banen zonder focale laesies. Eerdere resultaten [redacted] hebben laten zien dat alleen de combinatie van beide hits, t.w. [redacted] zorgt voor verstoorde myelinisatie en schade aan de witte stof banen. [redacted] wordt veroorzaakt door het intraperitoneaal (i.p.) injecteren van [redacted]. Vervolgens worden [redacted]

##### Primaire uitkomstparameters

Primaire uitkomstparameters zijn de scores van gedragstesten (voor het meten van motoriek, cognitie, sociaal-emotioneel gedrag, en/of perifere sensibiliteit) en de mate van witte stof hersenschade (bepaald door histologie en/of *ex vivo* MRI). Secundaire uitkomstparameters omvatten o.a. concentraties van

RNA/eiwitten betrokken bij hersenschade, apoptose, neuroinflammatie, oxidatief metabolisme en neuroprotectie.

### **Behandelmethoden**

Na de inductie van hersenschade wordt met verschillende behandelmethoden getracht de mate van hersenschade en de gevolgen op gedrag te verminderen of te herstellen. Deze behandelmethoden zijn onderverdeeld in de volgende deelprojecten:

1. Neuroprotectie (gericht op bescherming tegen vroege schade)
  - A. Remmen van celdood
  - B. Remmen van inflammatie

### **Referenties:**

1. Volpe et al. 2003 Pediatrics
2. Eklind et al. 2001 Eur J Neurosci

---

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.

Wistar ratten worden in huis gefokt. Diffuse witte stofschade *zonder* focale laesies wordt geïnduceerd door middel van de volgende experimentele behandelingen:

- Inductie inflammatie: 2x intraperitoneale (i.p.) injectie met [REDACTED]
- De controle groepen worden geïnjecteerd met [REDACTED] in plaats van [REDACTED]

- Inductie hypoxie: Het dier wordt op [REDACTED] eenmalig gedurende [REDACTED] blootgesteld aan [REDACTED]
- De controle groep wordt niet blootgesteld aan verlaagd [REDACTED]

### **Gedragstesten:**

De dieren worden onderworpen aan één of een combinatie van de volgende gedragstesten. Keuze van gedragstesten is afhankelijk van wetenschappelijke vraagstelling en de beoogde patiëntenpopulatie voor de behandeling. Alle gedragstesten die gebruikt worden zijn bestaande en geaccepteerde testen om de betreffende gedragingen in knaagdieren te onderzoeken. De testen zijn opgezet in samenwerking met experts op het gebied van gedragsonderzoek (o.a. [REDACTED])

- Vroege motorieke ontwikkeling tijdens eerste 3 levensweken (o.a. omdraaireflex, grijpreflex, locomotor activiteit)
- Motor functie (o.a. cilindertest, rotarod, adhesive removal test)
- Cognitie (o.a. novel object recognition, modified holeboard, T maze)
- Kernsymptomen van autisme en ADHD (o.a. social interaction test, social novelty, repetitief (poets)gedrag, open veld, locomotor activiteit)

### **Behandelmethoden (0 tot 72 uur na inductie hypoxie):**

De volgende behandelmethoden kunnen in deze modellen worden onderzocht.

- Eiwitten die aangrijpen op P53/JNK cascade of inflammatie (TNFa, [REDACTED] receptoren) kunnen intra-peritoneaal (i.p.), intra-craniaal (i.c.) of subcutaan (s.c.) geïnjecteerd worden. In principe wordt gekozen voor een klinisch toepasbare toedieningsvorm, te weten i.p. of s.c., tenzij het bekend is dat deze stoffen niet in staat zijn de bloed-brein barriere te passeren. In dat geval wordt gekozen voor i.c. injectie. (Deze behandelingen zijn onderdeel van deelprojecten 1A en 1B)

### **Randomisering en blinding**

Om nest-effecten tussen groepen te voorkomen, worden binnen in één nest de pups willekeurig verdeeld over de verschillende experimentele groepen. De uitvoerend onderzoeker krijgt geblindeerde oplossingen met behandelstoffen en weet dus niet aan welke stof elke moeder of pup wordt blootgesteld (bijv. in geval van [REDACTED] of behandeling van de pups).

Terminatie (0 dagen tot 4 maanden na inductie hypoxie):

Dieren worden gedood door middel van overdosis aan euthasaat. De leeftijd waarop de dieren worden gedood is afhankelijk van de wetenschappelijke vraagstelling.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen. Een negatieve controle groep ondervindt geen [REDACTED] [REDACTED] een positieve controle groep wordt blootgesteld aan zowel [REDACTED] en vervolgens behandeld met vehicle (wel hersenschade, geen therapeutisch effect). Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de kwaliteit van het model te waarborgen en om als basiswaarden voor de primaire uitkomstparameters te dienen.

De experimenten worden uitgevoerd per behandelmethode en opgesplitst op basis van een specifieke en gerichte deelonderzoeksvraag. Op deze manier is het experiment praktisch uitvoerbaar en is de statistische analyse niet te complex. De deelonderzoeksvraag bepaalt dan ook de statistische analyse (bijvoorbeeld één- of twee-weg ANOVAs met post-hoc test).

De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de meest relevante parameter en een daarbij passende powerberekening. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de uitkomst van een gedragstest of de mate van hersenschade (bijvoorbeeld met Myelin Basic Protein (MBP) als maat voor myeline verlies). Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen met een power van 90% en een alfa van 5%. In deze powerberekening wordt gecorrigeerd voor het aantal vergelijkingen middels de Bonferroni correctie. In geval van een twee-weg ANOVA wordt bij de steekproefberekening tevens rekening gehouden met een mogelijk interactie effect.

## **B. De dieren**

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

Deze experimenten worden in ratten uitgevoerd. Er is gekozen voor Wistar ratten. Deze ratten worden in huis gefokt, om maternale stress tijdens transport te voorkomen.

Er is geen voorkeur voor geslacht, zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen worden gebruikt in de experimenten.

### **Geschatte aantallen:**

Het geschatte aantal dieren per experiment is afhankelijk van het type experiment. Er zullen 3 type experimenten worden uitgevoerd:

1. Dosis-respons experiment: voor het bepalen van de meest effectieve dosis van een stof; er zullen 3 doses getest worden.
2. Therapeutisch window experiment: voor het bepalen binnen welk tijdsvenster een stof effectief is en dus wat een optimaal behandelstip is); er zullen 3 tijdstippen getest worden.
3. Outcome experiment: voor het vergelijken van de effectiviteit van verschillende stoffen op verschillende uitkomstparameters of tijdstippen

De grootte van het gevonden relatieve effect tussen de groepen zal bij een dosis response en een therapeutisch window experiment kleiner zijn ( $\pm 12\%$ ) dan bij een outcome experiment ( $\pm 14\%$ )

In de experimenten met dit diermodel observeren we doorgaans een variatie van 10%. Gebruik makend van een ANOVA met Bonferroni correctie op een alfa van 5%, en met een power van 90%, betekent dit dat een groepsgrootte van 21 dieren nodig is voor een dosis-respons of therapeutisch window experiment en een groepsgrootte van 16 dieren voor een outcome experiment.

Dit betekent dat we per experiment het volgende aantal dieren nodig hebben:

| Opzet dosis-respons experiment |              |                    |                   |        |
|--------------------------------|--------------|--------------------|-------------------|--------|
| Exp groep                      | Groepen      | Behandeling        | Dosis             | Aantal |
| 1                              | SHAM         |                    |                   | n=21   |
| 2                              | hersenschade | VEHICLE            | hoogst equivalent | n=21   |
| 3                              | hersenschade | experimentele stof | dosis 1           | n=21   |
| 4                              | hersenschade | experimentele stof | dosis 2           | n=21   |
| 5                              | hersenschade | experimentele stof | dosis 3           | n=21   |
| Totaal aantal dieren:          |              |                    |                   | 105    |

| Opzet therapeutisch window experiment |              |                    |                |        |
|---------------------------------------|--------------|--------------------|----------------|--------|
| Exp groep                             | Groepen      | Behandeling        | Start tijdstip | Aantal |
| 1                                     | SHAM         |                    |                | n=21   |
| 2                                     | hersenschade | VEHICLE            | tijdstip 1     | n=21   |
| 3                                     | hersenschade | experimentele stof | tijdstip 1     | n=21   |
| 4                                     | hersenschade | experimentele stof | tijdstip 2     | n=21   |
| 5                                     | hersenschade | experimentele stof | tijdstip 3     | n=21   |
| Totaal aantal dieren:                 |              |                    |                | 105    |

| Opzet outcome experiment |              |                         |        |
|--------------------------|--------------|-------------------------|--------|
| Exp groep                | Groepen      | Behandeling             | Aantal |
| 1                        | SHAM         |                         | n=16   |
| 2                        | hersenschade | VEHICLE                 | n=16   |
| 3                        | hersenschade | bv experimentele stof 1 | n=16   |
| 4                        | hersenschade | bv experimentele stof 2 | n=16   |
| 5                        | hersenschade | bv experimentele stof 3 | n=16   |
| Totaal aantal dieren:    |              |                         | 80     |

#### Het te verwachten maximaal aantal dierproeven en proefdieren per deelproject:

Een uitgebreid overzicht van alle uit te voeren dieproeven is weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. Tevens is weergegeven in deze tabel of dosis en/of therapeutisch window al bekend is of nog onderzocht dient te worden.

Hieronder is een beknopt overzicht weergegeven van het aantal dieren per deelproject.

NB: Het te verwachten aantal dierproeven is het mogelijk maximale aantal en is daarom gebaseerd op positieve resultaten. Indien een negatief resultaat gevonden wordt op een GO/NO GO moment, zal uiteraard een NO GO ingezet worden. Wanneer een NO GO wordt bereikt zal het totaal aantal dieren dus lager uitvallen.

| Deelproject           | Diermodel | Soort experiment | Aantal experimenten | Aantal rat |
|-----------------------|-----------|------------------|---------------------|------------|
| 1A                    | 3 (Rat)   | Outcome          | 3                   | 240        |
| 1B                    | 3 (Rat)   | Dosis respons    | 3                   | 315        |
|                       |           | Therap. window   | 6                   | 630        |
|                       |           | Outcome          | 5                   | 400        |
| Totaal aantal dieren: |           |                  |                     | 1585       |

#### Totaal aantal moeders

Voor het verkrijgen van 1585 ratten zullen bij een nestgrootte van 8 pups/ nest 199 zogende moeders nodig zijn. Aangezien 10% van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, vragen wij 20 extra ratten moeders aan. Dit maakt een totaal van **219 zogende rattenmoeders**.

### 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.

Indien beschikbaar hergebruiken we fokmoeders die eerder binnen deze projectaanvraag gebruikt zijn voor fok (zoals vermeld onder sectie B van bijlage I en III) en niet behandeld zijn in dat experiment.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met inachtneming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

#### Vervanging

Het model voor witte stof hersenschade is ontworpen om de ontwikkeling en behandeling van neonatale hersenschade te kunnen onderzoeken specifiek gericht op te vroeg geboren neonaten. Vanwege de complexe pathofysiologie van hersenschade en de grote bijdrage van andere orgaansystemen (o.a. het immuunsysteem en de bloed-hersenbarrière), is het niet mogelijk om dit gehele systeem *in vitro* na te bootsen. Daarnaast is functionele outcome (gedrag) een belangrijke uitkomstparameter, wat alleen in het levende dier gemeten kan worden.

Indien mogelijk wordt voorafgaand aan een dierexperiment de effectiviteit van een behandelmethode *in vitro* getest met behulp van neuronale of gliale celkweken. Tevens dienen deze *in vitro* systemen voor het identificeren van moleculaire en cellulaire cascades die betrokken zijn bij neuroprotectie en neuroregeneratie.

#### Vermindering

Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele- en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de correcte vergelijkingen maken voor het aannemen of verwerpen van onze hypothese, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening (zie uitleg punt A). Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. Verder zullen zoveel mogelijk gedragsmetingen sequentieel in dezelfde dieren worden gemeten en waar mogelijk *ex vivo* MRI experimenten met histologische metingen gecombineerd worden.

#### Verfijning

Aantasting van het welzijn wordt zoveel mogelijk beperkt doordat de handelingen worden uitgevoerd door of onder leiding van onderzoekers en biotechnici die al jaren ervaring hebben met dit model en de handeling zo efficiënt mogelijk kunnen uitvoeren. Daardoor worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder. Om stress te voorkomen bij de moeder, blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zwangere en zogende moeders extra tissues met plastic doorloop in de kooi om een nest te bouwen.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren bij de dieren. De dieren worden behandeld door ervaren

medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.  
De dieren worden in groepen gehuisvest.

## 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.

Geen wettelijk vereist onderzoek, dus n.v.t.

## 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.

De zwangere moeders worden in afwachting van hun bevalling enkele dagen solitair gehuisvest omdat de exacte geboortedatum van de pups moet worden vastgesteld. Standaard wordt er een shelter en tissues geplaatst in de kooi.

### 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 > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- Stress



- Na injectie van ██████████ kan er licht ongerief optreden (pilo-erectie). Dit verdwijnt na enkele uren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- Stress kan ontstaan ten gevolge van het verstoren van de nesten, het scheiden van de pups en de moeder tijdens hypoxie, en het oppakken van de dieren
- Licht ongerief ontstaat na de i.p. injectie met ██████████

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

Om stress bij moeder en pups zo laag mogelijk te houden, worden de pups zo kort mogelijk gescheiden van moeder en blijft er altijd minimaal één pup aanwezig in het nest bij de moeder. Daarnaast krijgen de zogende moeders ter beschutting van het nest extra tissues met shelter in de kooi.

Om stress ten gevolge van oppakken te verkleinen, wordt ernaar gestreefd de behandelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren. De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

#### 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.

Na blootstelling aan hypoxie kan er in een heel enkel geval onvoldoende activiteit, aanhoudende dyspnoe of tachypnoe worden waargenomen. De dieren worden de eerste 48h 1x per dag door de onderzoeker gecontroleerd. Incidenteel zal er een pup gedurende de eerste twee dagen na de operatie teveel achterblijven in groei of niet genoeg drinken. Dit wordt waargenomen door respectievelijk een ingevallen buik of geen melk zichtbaar in de maag van de pup. Wanneer dit geobserveerd wordt, zal het dier worden gedood. De dieren worden de eerste 48h 1x per dag door de onderzoeker gecontroleerd. Bij experimenten waarbij de dieren >een week in leven blijven, worden de dieren wekelijks gewogen, bij achterblijven in groei en/of gewichtsafname van >20% zal het dier worden gedood.

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

Uit onze voorgaande studies is gebleken dat in praktijk <1% van de dieren deze criteria haalt

#### 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.

Pups blootgesteld aan ██████████ matig  
Controle pups (██████████) (± 20%): licht  
██████████ blootgesteld aan lage dosis ██████████ licht  
██████████ blootgesteld aan vehicle: licht

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De nakomelingen worden na afloop van het experiment gedood vanwege de noodzaak om weefsels te verzamelen voor verdere analyse in het laboratorium. Omdat de mate van hersenschade een belangrijke uitkomstparameter is, is het doden van het dier als eindpunt voor dit experiment noodzakelijk, zodat analyses kunnen worden uitgevoerd op de hersenen.

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.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

|  |             |  |
|--|-------------|--|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 11557       |  |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | UMC Utrecht |  |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer  | Type dierproef                                   |
|  | 3           | Neuronale en gliale cellen voor primaire celweek |

*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.

Met behulp van primaire celweek kunnen we mechanistische vragen beantwoorden over de complexe interactie tussen verschillende cellen die betrokken zijn bij het ontstaan van hersenschade en kunnen we de effecten van verschillende compounds testen op inflammatoire en apoptotische cascades. Voor deze *in vitro* testen worden neuronen, microglia, oligodendrocyten en astrocyten geïsoleerd uit weefsel van embryonale of neonatale ratten of muizen. Na isolatie van de neurale cellen onderzoeken we in het lab hoe deze cellen reageren op verschillende stimuli (o.a. inflammatiefactoren, excitotoxiciteit, oxidatieve stress) en of we processen zoals apoptose, proliferatie, differentiatie, en inflammatie kunnen beïnvloeden door blootstelling aan potentiëel therapeutische compounds. Dit wordt gedaan aan de hand van morfologische inspectie, immunofluorescente kleuringen, en bepaling van RNA/eiwitconcentraties.

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.

C57/BL6 muizen of Wistar ratten worden zonder ongerief in huis gefokt. De nakomelingen ondergaan de volgende **experimentele behandeling**:

Tussen embryonale dag E14 en postnatale dag P10 worden embryo's of pups geëuthanaseerd met een overdosis euthasaat, waarna de hersenen worden geïsoleerd. De dag van terminatie is afhankelijk van het celtype dat geïsoleerd wordt. De embryo's of pups ondergaan verder geen experimentele handelingen.

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

Om zo betrouwbaar mogelijke resultaten uit dit type dierproef te verkrijgen wordt altijd gebruik gemaakt van de juiste controle en behandelgroepen in de *in vitro* experimenten. In de negatieve controle groep worden cellen blootgesteld aan vehicle/medium waarin de stimuli worden opgelost. Daarnaast wordt een

positieve controle groep meegenomen waarin cellen worden blootgesteld aan de gewenste stimulus/stimuli en vervolgens behandeld met de vehicle-oplossing waarin de potentiële therapeutische component is opgelost. Deze controle groepen zijn noodzakelijk om de kwaliteit van het *in vitro* model te waarborgen en om als basiswaarden voor de primaire uitkomstparameters te dienen.

De experimenten worden uitgevoerd per behandelmethode en opgesplitst op basis van een specifieke en gerichte deelonderzoeksvraag. Op deze manier is het experiment praktisch uitvoerbaar en is de statistische analyse niet te complex. De deelonderzoeksvraag bepaalt dan ook de statistische analyse (bijvoorbeeld één- of twee-weg ANOVAs met post-hoc test).

De groepsgrootte wordt bepaald aan de hand van de meest relevante parameter en een daarbij passende powerberekening. Hier kan bijvoorbeeld gekozen worden voor de mate van cel differentiatie (bijvoorbeeld expressie van myeline door oligodendrocyten). Aan de hand van eerdere experimenten met een vergelijkbare opzet kunnen we berekenen wat het window van effect en de variatie is voor de gekozen parameter. We baseren de groepsgrootte op de aantallen die uit de powerberekening komen met een power van 90% en een alfa van 5%. In deze powerberekening wordt gecorrigeerd voor het aantal vergelijkingen middels de Bonferroni correctie. In geval van een twee-weg ANOVA wordt bij de steekproefberekening tevens rekening gehouden met een mogelijk interactie effect.

Een voorbeeld van de groepen in een *in vitro* proef ziet er als volgt uit:

|                               | Veh | █   | █   | █   | █   | █   | █   | █   |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ongedifferentieerde OGD + Veh | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 |
| Ongedifferentieerde OGD + █   | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 |
| Gedifferentieerde OGD + Veh   | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 |
| Gedifferentieerde OGD + █     | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 | N=6 |

In dit voorbeeld worden het effect van 8 verschillende stimuli (gericht op inflammatie of oxidatieve stress) getest op de differentiatie-capaciteit van pre-oligodendrocyten (OGD). Daarnaast wordt getest of █ een potentieel therapeutische component in staat is differentiatie te bevorderen in een omgeving van inflammatie of oxidatieve stress.

In dit type experimenten wordt het totaal aantal breinen die nodig zijn voor één experiment gezamenlijk gehomogeniseerd en opgewerkt tot één pool van cellen. Deze pool van cellen wordt vervolgens verdeeld over de verschillende wellen. Omdat de cellen uit één pool komen, betekent dit dat alle welletjes dezelfde soort cellen bevatten van dezelfde dieren en er dus geen diervariatie aanwezig is, noch tussen de wellen, noch tussen de groepen.

Voor de poweranalyse wordt gebruik gemaakt van de tweezijdige ongepaarde t-toets een variatie van 5% en een aan te tonen relatief effect van 12%. Doorgaans worden er in één experiment ± 10 vergelijkingen gemaakt, wat zorgt voor een alfa van  $0.05/10=0.005$ . Met een power van 90% betekent dit dat er een groepsgrootte van 6 welletjes nodig is om het te verwachten verschil statistisch te detecteren.

## B. De dieren

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

Deze experimenten worden zowel met muizen als met ratten weefsels uitgevoerd. Deze keuze van diersoort is afhankelijk van de experimentele vraagstelling en de beoogde potentiële therapeutische componenten. Er is gekozen voor Sprague Dawley ratten en C57/BL6 muizen. Beide stammen worden wereldwijd gebruikt als *in vitro* model voor het isoleren en kweken van de desbetreffende celtypen als model voor neonatale hersenschade. █ heeft jarenlange ervaring met het isoleren van neurale cellen uit beide diersoorten. Beiden diersoorten worden in huis gefokt, om maternale stress tijdens transport te voorkomen. Er is geen voorkeur voor geslacht, zowel mannelijke als vrouwelijke nakomelingen worden gebruikt in de experimenten.

We zijn bewust van het feit dat we in deze experimenten Sprague Dawley ratten gebruiken, terwijl de experimenten uit bijlage I en II worden uitgevoerd in Wistar ratten. De reden hiervoor, is dat het protocol voor neurale celisolatie is overgenomen uit het bekende Nature Protocol artikel van Chen et al. (1). Omdat

dit protocol wereldwijd wordt gebruikt met cellen uit Sprague Dawley ratten, en wij het belangrijk vinden dat onze resultaten vergelijkbaar zijn met de resultaten uit de literatuur, hebben we besloten voor deze experimenten Sprague Dawley ratten te gebruiken.

Uit eerdere experimenten weten we dat we uit 10 breintjes voldoende cellen kunnen isoleren voor 1 *in vitro* experiment van 50-100 welletjes van de desbetreffende cellen. Om alle *in vitro* vragen te kunnen beantwoorden in deze projectaanvraag, verwachten de komende jaren per jaar 10 *in vitro* experimenten uit te voeren met muizen en 10 experimenten met ratten, waarvan elk 9 met pups en 1 met embryo's. Om deze experimenten uit te voeren zijn voor 5 jaar: 9 experimenten x 10 pups x 5 jaar = **450 muizenpups en 450 rattenpups nodig**. Daarnaast zijn voor deze experimenten: 1 experimenten x 10 embryo's x 5 jaar = **50 muizenembryo's en 50 rattenembryo's nodig**.

Deze dieren zullen gefokt worden op lopende fokprotocollen voor muis en rat binnen onze onderzoeksgroep. Wanneer embryo's worden gebruikt, wordt tevens de moeder gedood. Dit betekent dat voor deze experimenten ook moeders worden aangevraagd:

Een drachtige muis draagt gemiddeld 6 pups, er dus zijn  $50 / 6 = 9$  moedermuizen nodig. Aangezien 10 % van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, zijn er in totaal **10 zogende moedermuizen** nodig.

Een drachtige rat draagt gemiddeld 8 pups, er dus zijn  $50 / 8 = 7$  moederratten nodig. Aangezien 10 % van de moeders niet drachtig raakt, de pups verliest of kannibaliseert, zijn er in totaal **8 zogende moederratten** nodig.

#### Referenties:

1. Chen et al. 2007 Nature Protocols

### 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.

Indien beschikbaar hergebruiken we moeders voor fok die eerder binnen deze projectaanvraag gebruikt zijn voor fok (zoals vermeld onder sectie B van bijlage I en III) en niet behandeld zijn in dat experiment.

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.

De experimentele strategie beschreven bij punt A is opgesteld met inachtneming van de methodes om vervanging, vermindering en verfijning toe te passen.

#### Vervanging:

Onsterfelijke neuronale of gliale cellijnen zijn beschikbaar, maar verschillen te veel van primair geïsoleerde neuronen, oligodendrocyten, astrocyten en microglia. Verkregen resultaten op basis van deze cellijnen zijn dus moeilijk te transleren naar de functie van de respectieve celtypen zoals deze aanwezig zijn in het organisme.

In deze studie worden cellen geïsoleerd uit het brein van rattenpups en muizenpups en deze worden vervolgens in kweek gezet. De dieren zelf ondergaan geen experimentele handelingen. Deze *ex vivo* methode zal onder andere worden gebruikt om potentiële therapieën te selecteren voordat de teststoffen getest worden in langdurige *in vivo* experimenten. Door het vervangen van lange *in vivo* studies met deze *ex vivo* methode, ondergaan de dieren minder ongerief.

#### Vermindering:

Het aantal diergroepen per experiment wordt beperkt door alleen de meest noodzakelijke experimentele en controle groepen te kiezen. Op deze manier kunnen we de correcte vergelijkingen maken voor het aannemen of verwerpen van onze hypothese, maar beperken we het aantal groepen. Per groep wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren berekend aan de hand van een powerberekening (zie uitleg punt A). Deze berekening wordt gebaseerd op een parameter waar in het verleden duidelijke resultaten mee zijn behaald. Door vooraf te bepalen wanneer een effect relevant is en wat de verwachte spreiding is binnen de groep, kunnen we de groepsgrootte exact berekenen. Verder zullen zoveel mogelijk celtypes gecombineerd geïsoleerd worden waar mogelijk, bv een gemengde glia kweek met microglia en oligodendrocyten.

Verfijning:

Aantasting van het welzijn wordt zoveel mogelijk beperkt doordat de handelingen worden uitgevoerd door of onder leiding van onderzoekers en biotechnici die al jaren ervaring hebben. De zwangere en zogende moeders krijgen extra tissues met kartonnen huisje/shelter in de kooi om een nest te bouwen. De pups worden als geheel nest uit de kooi gehaald bij opoffering zodat de moeder niet meerdere malen stress ondervindt van het weghalen van enkele pups.

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.

Aangezien het welzijn zou kunnen worden aangetast door stress, wordt ernaar gestreefd de handelingen zo kort en efficiënt mogelijk uit te voeren (nest ineens weghalen). De dieren worden behandeld door ervaren medewerkers zodat eventueel ongemak vanwege het hanteren tot een minimum wordt beperkt.

De dieren worden zoveel mogelijk in groepen gehuisvest.

## 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.

## 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 > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

De pups worden in 1x uit het nest gehaald, zodat meerdere verstoringen voorkomen worden.

### 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.

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

### 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.

Licht ongerief

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De nakomelingen worden geofferd omdat de hersenen geogst worden om de celkweken te kunnen inzetten.

Indien de moeders (zoals vermeld in sectie B) niet gedood worden voor embryonale celkweken, kunnen deze hergebruikt worden als fokmoeder voor volgende experimenten binnen deze projectaanvraag.

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

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2016.I.557.009
2. Titel van het project : Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein
3. Titel van de NTS : Bescherming en herstel van hersenschade bij pasgeborenen

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : DEC-Utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 23-05-2016  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 01-06-2016, 17-08-2016, 07-09-2016 en 11-02-2016  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 07-06-2016/04-08-2016, 23-08-2016/07-09-2016 en 13-10-2016/21-10-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 14-11-2016

#### 7. De aanvraag is afgestemd met de IvD en deze is hiermee akkoord.

#### 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 07-09-2016
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: vo art.9 onderzoeker + art. 9 onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:

De DEC wil graag meer achtergrond, waarin de hypothesen genoemd worden met betrekking tot de therapeutische ingrepen; wat gaan de onderzoekers doen en waarom. Ook leest de DEC graag wat over mogelijke consequenties van de therapieën later in het leven. De DEC heeft wat twijfels over verschillende therapieën, dus vindt het belangrijk dat deze goed beargumenteerd worden. Als voorbeeld noemt de DEC de [REDACTED]; de literatuur is hier zeer terughoudend over. De onderzoeker reageert met het feit dat er in [REDACTED] [REDACTED] veel onderzoek is verricht met betrekking tot [REDACTED] en dat [REDACTED] zich niet kan



vinden in de stelling dat remming onverstandig is. De DEC verzoekt haar dit goed te beargumenteren in de aanvraag, ondersteund met literatuur.

Met betrekking tot de doses van de te gebruiken stoffen, moet worden aangegeven of al bekend is wat de juiste dosis is. Dit moet goed toegelicht worden. Mocht de juiste dosis niet bekend zijn, dan moet er een dose-finding-studie ingepland worden, met de bijbehorende dieren. Dit moet ook terug te vinden zijn in de bijlagen. De onderzoekers zullen hiernaar kijken.

De DEC geeft de onderzoekers de overweging mee om het project niet te breed op te schrijven, omdat er anders teveel tekst in de aanvraag komt, wat het moeilijk leesbaar maakt. Onderzoekers geven aan bereid te zijn om de aanvraag op te delen in meerdere aanvragen, als dit het voor de DEC makkelijker te beoordelen maakt. Om deze keuze te maken, is het volgens de DEC echter belangrijk om te bedenken en te benoemen hoe afhankelijk de verschillende deelprojecten van elkaar zijn. Tevens is het belangrijk om niet teveel go/no go-momenten te hebben, omdat dit het project ontoetsbaar kan maken. De go/no go-momenten moeten in elk geval allemaal duidelijk beschreven worden, waarbij het aantal dieren gebaseerd wordt op alle go's. De DEC raadt aan om alleen go/no go-momenten te hanteren die gebaseerd zijn op de hypothesen en niet op zaken daarbuiten die mis kunnen gaan. De DEC laat de onderzoekers vrij in hun keuze om de aanvraag al dan niet op te splitsen.

Tenslotte moet in de bijlagen duidelijk worden gemaakt waar het maximaal aantal proefdieren per onderdeel op gebaseerd is.

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

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 07-06-2016
- Datum antwoord: 04-08-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC verzoekt u kort toe te lichten om wat voor een operatie het hier gaat.  
*In de NTS is de operatie kort toegelicht: "... Als gevolg van de operatie, waarbij de halsslagader eenzijdig wordt afgesloten, kunnen de dieren kortdurend pijn ondervinden..."*

Projectvoorstel

- Algemene opmerking: Het projectvoorstel heeft in de huidige format alle kenmerken van een programma in plaats van een project (een programma omvat doorgaans meerdere projecten en heeft een doel dat op een hoger abstractieniveau ligt, terwijl een project een concretere onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd beoogd resultaat). De aanvraag beschrijft eigenlijk een heel onderzoeksgebied: u richt zich op het ontstaan van neonatale hersenschade en op bescherming en regeneratie van het hersenweefsel. Al het onderzoek op dit terrein zou in

de komende vijf jaar door u onder deze projectvergunning uitgevoerd kunnen worden. Uw aanvraag is op zichzelf een heldere beschrijving van het onderzoeksterrein waarop u de afgelopen jaren heeft gewerkt en waarop ook na de komende 5 jaar nog door u gewerkt zal worden. Op die manier wordt het voor de DEC echter niet helder wat de onderzoeksvragen zijn die u de komende 5 jaar wenst te beantwoorden. De DEC wijst u erop dat er alleen vergunningen verleend kunnen worden voor projectaanvragen waarbij een ethisch verantwoorde schade baten analyse gemaakt kan worden (dit is in het geval van een programma niet goed mogelijk). De DEC raadt u aan om in het projectgedeelte van de aanvraag (niet in de bijlages) concreter te worden over de projecten die schuilgaan achter deze aanvraag (en de daaraan gekoppelde onderzoeksvragen). Van belang is ook dat duidelijker wordt wat uw concrete doelstellingen zijn voor de komende vijf jaar. Welke belangrijke stappen wilt u in die vijf jaar zetten? De te volgen strategie dient daar logisch bij aan te sluiten en de rol van de voorgestelde dierproeven in die strategie dient helder te zijn. De DEC verzoekt u daarnaast ook specifieker aan te geven welke stoffen gebruikt zullen worden. De DEC ziet uw herschreven projectvoorstel graag tegemoet.

1. Welke deelprojecten gaan schuil?

*De projectaanvraag is in grote mate aangepast naar aanleiding van de opmerkingen van de DEC. In sectie 3.1 Achtergrond is het onderdeel "Onderverdeling van de projectaanvraag" toegevoegd, en is het project verdeeld in 5 verschillende deelprojecten (1A,B en 2A-C), gebaseerd op 5 verschillende behandelmethoden.*

2. Welke doelstelling en onderzoeksvragen horen bij deze projecten?

*In sectie 3.2 Doel is per deelproject de doelstellingen omschreven en bijbehorende onderzoeksvragen benoemd. Daarbij is specifiek aangegeven wat voor soort stoffen of cellen getest zullen worden.*

3. Laat de strategie logisch aansluiten op deze projecten

*In sectie 3.4.1 is de algemene opzet van het project verhelderd door in 4 stappen weer te geven welke gedachtegang gevolgd wordt bij het opzetten van een dierproef. In sectie 3.4.1 en 3.4.2 zijn de 3 diermodellen beschreven die gebruikt worden voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen en is in detail beschreven welk diermodel zal worden gebruikt voor welk deelproject. In sectie 3.4.3 is de strategie per deelproject in schema's weergegeven met ingebouwde Go/NoGo momenten.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De ratio voor het gebruik van een infectie geïnduceerd LPS-model is de DEC niet helder. Waarom is niet gekozen voor, bijvoorbeeld, een heatstress-model? Graag verhelderen.  
*Voor te vroeg geboren kinderen is bekend dat maternale en postnatale inflammatie zeer belangrijke risicofactoren zijn voor het ontstaan van en een slechter ziekteverloop van witte stof hersenschade. Omdat inflammatie een belangrijke component is in het ontstaan of beloop van neonatale hersenschade, is het klinisch zeer relevant om naast zuurstof tekort als causale factor ook inflammatie als causale factor mee te nemen in ons onderzoek. Deze informatie staat nu vermeld in zowel de 3.1 Achtergrond als 3.4 Onderzoeksstrategie.*

*Omdat niet bekend is dat hitte-stress een belangrijke risicofactor is voor neonatale hersenschade, vinden wij het heat-stress model geen translationeel model voor het onderzoeken van neonatale hersenschade. Als gevolg van sepsis kan hitte-stress aanwezig zijn, maar dan is het daadwerkelijk induceren van sepsis/perifere inflammatie naar onze mening beter te transleren naar de klinische situatie dan blootstelling aan alleen hitte.*

#### Bijlage 2

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Klopt het dat alle [REDACTED] [REDACTED] krijgen en alle pups [REDACTED] Graag duidelijker weergeven in het projectvoorstel.  
*Nee, de controle groepen worden niet blootgesteld aan [REDACTED] en ook niet aan [REDACTED]. Onder het kopje [REDACTED] staat: "De controle groepen worden geïnjecteerd met [REDACTED] in plaats van [REDACTED]." Onder het kopje nakomelingen staat: "De controle groep wordt niet blootgesteld aan [REDACTED] [REDACTED]"*
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Bij vermindering geeft u aan dat er MRI experimenten worden uitgevoerd, maar dat lijkt niet het geval, of het zou net als in bijlage 1 om ex vivo MRI onderzoek moeten gaan. Graag verhelderen/verwijderen. Dit geldt ook voor bijlage 1, punt D, vermindering en bijlage 2 punt A.  
*Inderdaad gaat het om ex vivo MRI, dit is nu helder vermeld in zowel bijlage 1 als 2.*

#### Bijlage 3

- B. De dieren: De DEC raadt u aan nogmaals te kijken naar welke embryo's wel en welke niet moeten worden meegeteld (vanaf E19 meetellen). Eventueel kunt u hiervoor contact opnemen met de IvD voor nader overleg.  
*Na overleg met IvD blijkt dat volgens de Wet op de dierproeven alle handelingen aan "foetale vormen van zoogdieren vanaf het laatste derde deel van hun normale ontwikkeling" beschouwd worden als dierproeven. Aangezien wij geen embyo's gebruiken voor E14-E15, rekenen we alle embryo's mee in de telling. De telling van bijlage III is dan ook niet veranderd t.o.v. de vorige versie.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.
- Datum vragen: 23-08-2016
- Datum antwoord: n.v.t.
- Opmerking DEC + uitnodiging gesprek:  
De DEC is van mening dat uw projectvoorstel op een te hoog aggregatieniveau is geschreven, waardoor bepaalde informatie – nodig om een navolgbare ethische afweging te kunnen maken – ontbreekt. De DEC moet bijvoorbeeld kunnen beoordelen of het aantal benodigde dieren en het te verwachten ongerief realistisch zijn ingeschat. Verder mist de DEC in het projectvoorstel een nadere onderbouwing en uitwerking van de therapeutische interventies en van de theoretische achtergronden daarvan. Wat zijn uw hypotheses met

betrekking tot die interventies en waar zijn die op gebaseerd? De DEC zou graag met u van gedachten wisselen over hoe het projectvoorstel het beste opgezet kan worden.

- Datum vragen: 13-09-2016
- Datum antwoord: 21-10-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- Algemeen: Hoewel de DEC op verschillende plaatsen graag meer achtergrondinformatie zou zien, is het niet te bedoeling dat de aanvraag, in verband met de leesbaarheid, teveel tekst gaat bevatten. De DEC heeft u ter overweging meegegeven om de aanvraag op te delen in meerdere kleine aanvragen. Het zou de toetsbaarheid kunnen bevorderen, de DEC heeft echter geen uitgesproken voorkeur. Graag uw reactie.

*Wij zijn van mening dat het uit elkaar trekken van deze projectaanvraag niet zal leiden tot een betere leesbaarheid en beter begrip van de opgezette studies. Deze projectaanvraag bevat dezelfde informatie als de opgedeelde aanvragen zouden bevatten. Daarnaast hebben alle studies een overeenkomstig doel voor ogen: het beschermen of herstellen van de beschadigde hersenen in de pasgeborene. Alle in deze projectaanvraag beschreven experimenten vallen binnen dit overkoepelende doel. Er is dermate veel samenhang tussen de onderlinge deelprojecten, diermodellen en vraagstellingen, dat het in onze ogen overzichtelijker is om de beschreven deelprojecten tezamen onder één projectaanvraag in te dienen.*

- 3.1 Achtergrond: Met betrekking tot de therapeutische ingrepen, acht de DEC het essentieel dat deze onderbouwd worden met hypothesen aangaande het veronderstelde werkingsmechanisme. Graag aanpassen.

*We zijn het erover eens dat er bij sommige gedeelten onvoldoende onderbouwing was van de mogelijke werkzaamheid van sommige therapeutische ingrepen, met name wat betreft P53 remmers, stamceltherapie, en het [REDACTED]. Deze informatie is toegevoegd aan 3.1 Achtergrond, waarbij zoveel mogelijk eerder [REDACTED] resultaten [REDACTED] of resultaten uit de literatuur, die essentieel kunnen zijn voor het begrip van de onderzoeksvragen, in beknopte vorm worden besproken. Denk hierbij aan werkingsmechanismen, doses, windows e.d. Deze informatie is in rode kleur opgenomen in de aanvraag zodat het duidelijk is voor de DEC waar deze nieuwe informatie zich bevindt. Tevens zijn bij de go/no go figuren (3.4.3.) nogmaals de hypothesen per deelproject opgenomen ter verduidelijking.*

- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u informatie op te nemen in uw aanvraag met betrekking tot mogelijke consequenties op de lange termijn van de door u gekozen behandelingen. Graag onderbouwen met literatuur en deze kort beschrijven.

*De mogelijk consequenties op lange termijn en veiligheidsaspecten, met name van de [REDACTED] [REDACTED] zijn nu kort beschreven en onderbouwd met [REDACTED] [REDACTED] en literatuur in 3.1 Achtergrond. Deze informatie is in rode kleur opgenomen in de aanvraag zodat het duidelijk is voor de DEC waar deze nieuwe informatie zich bevindt.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u alle go/no go-momenten duidelijk te baseren op de door u geformuleerde hypotheses.  
*In onderdeel 3.4.3. zijn de go/no go figuren per deelproject aangepast en verduidelijkt. Tevens hebben we per deelproject nogmaals de bijbehorende hypotheses opgenomen in deze figuren ter verduidelijking.*

#### Bijlagen algemeen

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Graag per stof beschrijven of al bekend is wat de juiste dosis is. Voor de stoffen waarvan dit niet bekend is, moet er een dose-finding studie ingepland en beschreven worden, inclusief het daarvoor benodigde aantal dieren. Graag aanpassen. Licht ook de stamceltherapie uitvoeriger toe (herkomst van de cellen, de bewerking die ze ondergaan). Is weliswaar niet de dierproef, maar deze informatie draagt wel bij aan het waarderen van het experiment.  
*Wij hebben ter verduidelijking van de gehele projectaanvraag figuur 3 opgenomen aan het einde van het Projectvoorstel. Deze tabel bevat alle informatie per deelproject over het al dan niet bekend zijn van dosis en therapeutisch window van de te testen strategie, en dus tevens of een dosis-response- of therapeutisch window-studie nog uitgevoerd zal moeten worden. Tevens wordt het uit deze figuur 3 duidelijk welk diermodel gebruikt zal worden voor het deelproject. Vervolgens hebben wij in tabelvorm in bijlagen 3.1 en 3.2 (onderdeel B. de dieren) beschreven hoeveel dieren nodig zullen zijn per experiment-vorm en in totaal per deelproject. Wij zijn van mening dat deze tabellen in de bijlagen samen met figuur 3 in het Projectvoorstel, de benodigde dieraantallen zeer inzichtelijk maken.*  
*Toelichting stamceltherapie: Zoals gewenst door de DEC hebben wij in het Projectvoorstel onder onderdeel 3.4.1., stap 3, meer informatie opgenomen over de stamcellen wat betreft herkomst, karakterisatie en kweekcondities. Deze informatie is in rode kleur opgenomen in de aanvraag zodat het duidelijk is voor de DEC waar deze nieuwe informatie zich bevindt.*
  - B. De dieren: De DEC verzoekt u het aantal dieren overal zo mogelijk te onderbouwen met een statistische berekening. Graag toevoegen.  
*Zie ook ons antwoord hierboven bij Bijlagen algemeen-A. Wij hebben ter verduidelijking figuur 3 opgenomen aan het einde van het Projectvoorstel. In bijlagen 3.1 en 3.2 (onderdeel B. de dieren) zijn tevens statistische berekeningen opgenomen per experiment-vorm (t.w. dosis-respons-, therapeutisch window- of outcome-experiment). De informatie in deze tabellen laat zien hoeveel dieren nodig zullen zijn per experiment-vorm en in totaal per deelproject.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

- Aard expertise:
- Deskundigheid expert:
- Datum verzoek:
- Strekking van het verzoek:



- Datum expert advies:
- Advies expert:

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. De aanvraag is toetsbaar en de beschreven deelprojecten en sub-deelprojecten vertonen een duidelijke samenhang. Hersenschade in pasgeboren baby's is een ernstig klinisch probleem met levenslange consequenties voor de patiënten, hun familie en de maatschappij. In de kliniek worden twee belangrijke patiëntengroepen onderscheiden op basis van hun ontwikkelingsfase: de voldragen baby's met acute hersenschade als gevolg van zuurstofgebrek bij de geboorte en de te vroeg geboren baby's met diffuse witte stof hersenschade met of zonder focale laesies. Voor beide patiënten groepen zijn momenteel, afgezien van de gebruikte acute hypothermie (koeling) voor voldragen baby's met ernstige acute hersenschade, geen therapieën beschikbaar. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling gericht op het in kaart brengen, middels dierexperimenteel onderzoek, van de pathofysiologie van genoemde typen hersenschade bij pasgeboren baby's en op onderzoek naar mogelijke nieuwe therapieën voor deze patiënt-doelgroepen.

Hersenschade bij het pasgeboren kind wordt in veel gevallen veroorzaakt door neonatale hypoxie-ischemie (HI). HI is een conditie van verlaagde zuurstofvoorziening (hypoxie) en doorbloeding (ischemie) in de organen, waaronder de hersenen. Door een tekort aan zuurstof en voedingsstoffen (o.a. glucose), en een ophoping van afvalstoffen kan een HI-insult in de hersenen weefselschade veroorzaken. Het tekort aan zuurstof en glucose veroorzaakt verhoogde membraan depolarisatie en verstoorde ATP- afhankelijke glutamaat heropname vanuit de synapsspleet. Glutamaat excitotoxiciteit (=overstimulatie van glutamaat receptoren) kan leiden tot celdood van neuronen en oligodendrocyten (gliacellen die myeline maken), onder andere via de productie van vrije radicalen zoals stikstofoxide. Deze cascade activeert tevens de andere gliacellen in de hersenen, te weten microglia en astrocyten, wat leidt tot een inflammatoire respons op de plaats van het insult. Inflammatie, zowel in de hersenen als systemisch, veroorzaakt meer neuronale celdood en uiteindelijk meer weefselschade. Er worden drie patiënt-doelgroepen onderscheiden:

1. Voldragen baby's met hersenschade als gevolg van acute asfyxie ("vertaald" in Diermodel 1).
2. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte-stofschade met focale laesies (Diermodel 2).
3. Te vroeg geboren baby's met hersenschade als gevolg van zuurstoftekort en infectie, gekarakteriseerd door diffuse witte-stofschade zonder focale laesies (Diermodel 3).



natuurlijke omgeving. Ook is het opzettelijk aanbrengen van hersenschade een aantasting van hun integriteit. Hun welzijn zal worden aangetast doordat ze stress en pijn ondervinden als gevolg van de experimenten, een aantal zal niet geboren kunnen worden en tenslotte zullen ze allemaal gedood worden. Het kennisreservoir m.b.t. tot hersenschade bij baby's als gevolg van vroeggeboorte en/of infectie, of als gevolg van een geboortetrauma, evenals de ontwikkeling van mogelijk therapieën om hersenschade te voorkomen, dan wel te herstellen zal door dit onderzoek verder gevoed worden. Deze kennis is van groot belang voor voortgang in dit onderzoeksveld. De onderzoekers hebben ook zelf belang bij dit onderzoek, omdat publicatie van aansprekende resultaten (nieuwe wetenschappelijke inzichten) kan leiden tot nieuw- of vervolgonderzoek [REDACTED]

[REDACTED]. Carrière mogelijkheden en commerciële belangen dienen naar de mening van de DEC Utrecht echter geen rol te spelen in de ethische afweging betreffende de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

#### *Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De DEC Utrecht is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC Utrecht is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Onderdeel 3.4 van de projectbeschrijving geeft een uitgebreide en transparante beschrijving van de onderzoeksstrategie. De primaire uitkomstparameters volgen uit 1) cognitieve en motorieke gedragsexperimenten zonder bijkomend ongerief, en 2) anatomische en biochemische analyses van de hersenen voor het bepalen van de mate van hersenschade of herstel daarvan. Afhankelijk van de onderzoeksvraag worden dieren op een tijdstip tussen de 0 dagen en 4 maanden gedood met een overdosis pentobarbital voor verdere analyse van weefsels. Op cruciale stadia van het onderzoek zijn go-no go beslissingen opgenomen, waardoor onnodig proefdiergebruik, wordt voorkomen. Naar aanleiding van deze informatie is de DEC Utrecht van mening dat het project goed doordacht is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen, de te gebruiken diermodellen goed beargumenteerd zijn binnen het kader van de vraagstelling en dat verwacht mag worden dat de doelstellingen van het project behaald zullen worden.



## Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buit instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
  - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht tot matig. De dieren ondergaan zo nodig (zie bijlage 1 en 2) een operatie om occlusie van de arteria carotis dextra en hypoxia te bewerkstelligen. In bijlage 3 wordt het gebruik van dieren beschreven waarbij hersenweefsel verzameld wordt voor de *in vitro* kweek van diverse neuronale elementen die gebruikt zullen worden voor *in vitro* onderzoek naar de effecten van therapeutische ingrepen dat vooraf zal gaan aan de *in vivo* experimenten.
- Bijlage 1  
Omvat 3990 muizen en 750 ratten. Dit zijn allemaal jonge pups, dan wel embryo's. Voor de fok daarvan zijn 732 zogende muizenmoeders nodig en 104 rattenmoeders. Ongerief: experimentele pups die sham-geopereerd worden ( $\pm 20\%$ ): licht. Experimentele pups die occlusie van de a. carotis dextra en hypoxia ondergaan ( $\pm 80\%$ ): matig. Zogende moeders: licht ongerief wegens verstoren van de nesten. Gedragstesten, alle dieren: licht.
- Bijlage 2  
Omvat 1585 rattenpups, waarvoor 219 rattenmoeders nodig zijn. Ongerief: pups blootgesteld aan [REDACTED] ( $\pm 80\%$ ): matig. Controle pups [REDACTED] ( $\pm 20\%$ ): licht. [REDACTED] blootgesteld aan lage dosis [REDACTED] licht [REDACTED] blootgesteld aan [REDACTED] licht. Gedragstesten alle pups: licht. Toediening therapeutica: licht of matig, afhankelijk van de wijze van toediening.
- Bijlage 3  
500 rattenpups en 500 muizenpups: Dieren worden geëuthanaseerd tussen embryonale dag E14 en postnatale dag P10 ten behoeve van *in vitro* experimenten: 100 % licht ongerief.
12. De integriteit van een groot deel van de gebruikte dieren wordt aangetast door het opzettelijk veroorzaken van hersenschade. Dit heeft een negatieve invloed op hun gedrag en

zelfredzaamheid en hun mogelijkheden om zich tot een normaal functionerende, volwassen muis te ontwikkelen.

13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Als gevolg van de operatie kan een gering percentage van de pups (1-3%) in groei achterblijven. Door de dieren regelmatig te monitoren kunnen deze achterblijvers tijdig uit het experiment worden genomen.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voorafgaand aan therapeutische ingrepen worden in bijlage 3 *in vitro* experimenten beschreven welke gericht zijn op de gevolgen van hypoxie voor diverse typen van hersencellen en de effecten van therapeutische ingrepen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De DEC Utrecht is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel t.o.v. de gekozen strategie en looptijd. Het in bijlage 3 beschreven *in vitro* onderzoek betekent een reductie van het aantal proefdieren dat ingezet zal worden voor het testen van therapeutische ingrepen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De operaties zullen onder narcose worden uitgevoerd door ervaren medewerkers en er wordt adequate post-operatieve pijnstilling toegepast. Na de operaties vindt voldoende monitoring plaats en de humane eindpunten zijn goed geformuleerd.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Aan het einde van ieder experiment worden de dieren gedood op een wijze zoals toegestaan in de richtlijn. Het doden is noodzakelijk om post-mortem onderzoek aan de hersenen te kunnen verrichten.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen en ratten worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.



aspecten van het project toekent, is zij van mening dat het verkrijgen van inzicht in de mogelijke hersenschade van pasgeborenen en de pogingen tot het ontwikkelen van therapieën om deze schade te beperken, dan wel te herstellen, het gebruik van proefdieren zoals beschreven in de aanvraag rechtvaardigt.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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  
AVD115002016751

**Bijlagen**

2

Datum 21 november 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 november 2016. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016751. 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](http://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: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████  
Functie: Associate Professor  
Afdeling: ██████████  
Telefoonnummer: ██████████  
E-mailadres: ██████████

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Post-doctoraal onderzoeker  
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 december 2016  
Geplande einddatum: 1 december 2021  
Titel project: Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein  
Titel niet-technische samenvatting: Bescherming en herstel van hersenschade bij pasgeborenen  
Naam DEC: Dec Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht D01.343  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.441,-  
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:   
Functie: decaan  
Plaats: Utrecht  
Datum: 16 november 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80011  
3508 TA UTRECHT  


**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  
AVD115002016751  
**Bijlagen**  
2

Datum 21 november 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 21 november 2016  
Vervaldatum: 21 december 2016  
Factuurnummer: 16700751  
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag     |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD115002016751 | € 1.441,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL29INGB 070.500.1512 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 14 december 2016 16:10  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** aanvullende informatie aanvraag AVD115002016751  
**Bijlagen:** AVD115002016751\_AanhoudenBeoordelenBrief.pdf

Geachte [REDACTED]

Op 21 november 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In de bijgaande brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Maar om u aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we graag uw reactie uiterlijk **woensdag 21 december 2016**.

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
*Uitvoeringsexpert*

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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  
AVD115002016751

Datum 14 december 2016

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 21 november 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

### **Welke informatie nog nodig**

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

### **Onduidelijkheden**

1) U geeft aan in uw aanvraag twee verschillende deelprojecten - neuroprotectie en neuroregeneratie- te willen uitvoeren in drie verschillende diermodellen. De samenhang tussen de twee deelprojecten, tussen de drie diermodellen en tussen de 3 bijlages dierproeven is voor ons niet duidelijk. U geeft zelf aan dat de experimenten in parallel kunnen worden uitgevoerd. Daarnaast is uw experimentele opzet vrij complex, met veel mensen die eraan zullen werken. Daarom is de kans groot dat uw aanvraag meer als een programma door de CCD wordt gezien dan als een project en niet zo vergund kan worden. Uit het DEC advies blijkt dat de DEC u ook hierover geattendeerd heeft.

Indien u van mening bent dat uw aanvraag wél één project is, verzoeken we u om de samenhang tussen de twee deelprojecten en tussen de dierproeven uit te werken en te onderbouwen waarom de dierproeven niet in aparte projecten kunnen worden uitgevoerd. U heeft duidelijk go/no-go momenten binnen de dierproeven beschreven. Indien er go/no-go momenten ook tussen de

dierproeven (tussen de bijlages) opgenomen zijn, graag deze en de beslisriteria benoemen.

**Datum:**  
14 december 2016  
**Aanvraagnummer:**  
AVD115002016751

2) In de bijlage dierproeven 3 bent u van plan embryo's in te zetten. Hoewel dieren pas na de geboorte als proefdieren geregistreerd, zijn ze volgens de wet in het laatste trimester van zwangerschap als dierproeven. Daarom moeten de embryo's apart in de aanvraag en in de vergunning worden aangegeven.

We verzoeken u het aantal embryo's dat in bijlage 3 wordt ingezet los van het aantal pups aan te geven.

3) Het aantal dieren uit bijlage 3 is niet in het totaal aantal dieren in de NTS opgenomen. We verzoeken u de NTS aan te passen.

### **Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuur u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

### **Wanneer een beslissing**

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



## Melding bijlagen

U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg altijd deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt. Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw Gegevens

Naam instelling: UMC Utrecht

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD115002016751

### 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vink de bijlagen aan of vul de naam of omschrijving in.

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

**Datum:**

14 december 2016

**Aanvraagnummer:**

AVD115002016751

**3 Ondertekening**

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:  
Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 15 december 2016 14:47  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: aanvullende informatie aanvraag AVD115002016751  
**Categorieën:** Dossier [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Graag wil de DEC ook reageren op uw eerste punt als volgt.

De DEC heeft uitvoerig met de aanvrager gecorrespondeerd over de kwestie die u aansnijdt in uw eerste vraag. Dit blijkt uit de vragen en antwoorden die integraal zijn opgenomen in het advies van de DEC. De aanvrager heeft toch de keuze gemaakt om de verschillende deelprojecten en sub-doelstellingen niet onder te brengen in aparte aanvragen. De DEC heeft daarmee uiteindelijk ingestemd. Voor de vraag waarom de DEC dat gedaan heeft verwijzen wij u naar deel C1 van het advies. Van alle experimenten is zonder meer aannemelijk gemaakt dat ze bijdragen aan het zelfde uiteindelijke doel dat ontegenzeggelijk van groot belang is: voorkomen of herstellen van hersenschade bij pasgeborenen. Alle deelprojecten en experimenten zijn zeer transparant beschreven en tot in detail toetsbaar. Ook is van elk onderdeel toetsbaar wat het nut van dat onderdeel is in het licht van het geheel. De DEC heeft zich gerealiseerd dat sommige delen van de aanvraag los van elkaar of parallel uitgevoerd kunnen worden, zonder dat de resultaten daarvan invloed hebben op de wijze van uitvoering van andere delen. De DEC heeft uiteindelijk geoordeeld dat, door de transparantie van het geheel, een ethische toetsing van het project waarin recht gedaan wordt aan de belangen van alle betrokken dieren, mogelijk is. De DEC twijfelde niet aan het belang, aan de kundigheid en vaardigheid van de onderzoekers en aan de kwaliteit van de opzet van dit onderzoek in proefdierkundig opzicht. Een verdere opsplitsing van de aanvraag in meerdere losse aanvragen zou er toe leiden dat de adviezen van de DEC over die losse aanvragen in elk geval voor wat betreft de ethische afweging gelijkloend zouden zijn. In dat opzicht dient het splitsen van de aanvraag geen redelijk doel. De DEC neemt namelijk aan dat de redenen om een bepaalde definitie van het begrip project te stipuleren, gelegen zijn in het feit dat men die projecten (ethisch) toetsbaar wil houden.

Voor wat betreft de punten 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het aan de aanvrager is om daarop te reageren.

Met vriendelijke groeten,



Secretaris DEC Utrecht | Raad van Bestuur, Kwaliteit en Patient Veiligheid, Bureau Toetsing van Onderzoek  
Universitair Medisch Centrum Utrecht | Kamernummer C01.106 | Huispostnummer D01.343 | Postbus 85500 | 3508 GA UTRECHT  
T: +31 88 75 592 47 | [www.umcutrecht.nl](http://www.umcutrecht.nl) | Werkdagen: ma, di, woe, do

De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren. Het Universitair Medisch Centrum Utrecht is een publiekrechtelijke rechtspersoon in de zin van de W.H.W. (Wet Hoger Onderwijs en Wetenschappelijk Onderzoek) en staat geregistreerd bij de Kamer van Koophandel voor Midden-Nederland onder nr. 30244197.



**Van:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]

**Verzonden:** woensdag 14 december 2016 16:19

**Aan:** dec-utrecht

**Onderwerp:** aanvullende informatie aanvraag AVD115002016751

Geachte DEC Utrecht,

Op 14 november 2016 heeft u advies uitgebracht op een project aanvraag met titel 'Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein' en aanvraagnummer AVD115002016751, uw kenmerk 2016.I.557.009.

De volgende vragen zijn aan de aanvrager voorgelegd:

**1)** *U geeft aan in uw aanvraag twee verschillende deelprojecten - neuroprotectie en neuroregeneratie- te willen uitvoeren in drie verschillende diersmodellen. De samenhang tussen de twee deelprojecten, tussen de drie diersmodellen en tussen de 3 bijlages dierproeven is voor ons niet duidelijk. U geeft zelf aan dat de experimenten in parallel kunnen worden uitgevoerd. Daarnaast is uw experimentele opzet vrij complex, met veel mensen die eraan zullen werken. Daarom is de kans groot dat uw aanvraag meer als een programma door de CCD wordt gezien dan als een project en niet zo vergund kan worden. Uit het DEC advies blijkt dat de DEC u ook hierover geattendeerd heeft.*

*Indien u van mening bent dat uw aanvraag wél één project is, verzoeken we u om de samenhang tussen de twee deelprojecten en tussen de dierproeven uit te werken en te onderbouwen waarom de dierproeven niet in aparte projecten kunnen worden uitgevoerd. U heeft duidelijk go/no-go momenten binnen de dierproeven beschreven. Indien er go/no-go momenten ook tussen de dierproeven (tussen de bijlages) opgenomen zijn, graag deze en de beslisriteria benoemen.*

**2)** *In de bijlage dierproeven 3 bent u van plan embryo's in te zetten. Hoewel dieren pas na de geboorte als proefdieren geregistreerd, zijn ze volgens de wet in het laatste trimester van zwangerschap als dierproeven. Daarom moeten de embryo's apart in de aanvraag en in de vergunning worden aangegeven.*

*We verzoeken u het aantal embryo's dat in bijlage 3 wordt ingezet los van het aantal pups aan te geven.*

**3)** *Het aantal dieren uit bijlage 3 is niet in het totaal aantal dieren in de NTS opgenomen. We verzoeken u de NTS aan te passen.*

Indien u hierop ook wil reageren horen we het graag.

Met vriendelijke groet,

  
Uitvoeringsexpert

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

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

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Bedankt voor uw reactie op onze aanvraag voor een projectvergunning voor het project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. Hieronder vind u onze reactie op uw opmerkingen en onduidelijkheden.

## Opmerking 1

*U geeft aan in uw aanvraag twee verschillende deelprojecten - neuroprotectie en neuroregeneratie - te willen uitvoeren in drie verschillende diermodellen. De samenhang tussen de twee deelprojecten, tussen de drie diermodellen en tussen de 3 bijlages dierproeven is voor ons niet duidelijk. U geeft zelf aan dat de experimenten in parallel kunnen worden uitgevoerd. Daarnaast is uw experimentele opzet vrij complex, met veel mensen die eraan zullen werken. Daarom is de kans groot dat uw aanvraag meer als een programma door de CCD wordt gezien dan als een project en niet zo vergund kan worden. Uit het DEC advies blijkt dat de DEC u ook hierover geattendeerd heeft.*

*Indien u van mening bent dat uw aanvraag wél één project is, verzoeken we u om de samenhang tussen de twee deelprojecten en tussen de dierproeven uit te werken en te onderbouwen waarom de dierproeven niet in aparte projecten kunnen worden uitgevoerd. U heeft duidelijk go/no-go momenten binnen de dierproeven beschreven. Indien er go/no-go momenten ook tussen de dierproeven (tussen de bijlages) opgenomen zijn, graag deze en de beslisriteria benoemen.*

## Antwoord 1

We begrijpen uw opmerking dat dit een grote aanvraag betreft. Hierover is gecorrespondeerd met de DEC, omdat zij in eerste instantie twijfelden of een ethische toetsing mogelijk was. Zoals de DEC persoonlijk naar u gecorrespondeerd heeft op donderdag 15 december jongstleden (zoals hieronder ingevoegd "Antwoord DEC Utrecht op Opmerking 1"), heeft zij na uitvoerig overleg met ons besloten dat opsplitsen van de aanvraag geen redelijk doelt dient, omdat dat ertoe zou leiden dat de ethische afweging van de DEC over die losse aanvragen gelijkloidend zou zijn. De DEC neemt daarbij aan dat de redenen om een bepaalde definitie van het begrip project te stipuleren gelegen zijn in het feit dat men die projecten (ethisch) toetsbaar wil houden. Voor meer informatie verwijzen wij naar de reactie van de DEC Utrecht op donderdag 15 december 2016.

Daarnaast zijn wij van mening dat zowel wetenschappelijk als technisch de samenhang van de aanvraag dermate groot is, dat opsplitsen zou leiden tot onduidelijkheid. Omdat de samenhang u niet geheel duidelijk is, lichten we deze graag hieronder toe.

De pathofysiologie van neonatale hersenschade in algemene zin volgt grofweg twee fases: De acute fase, bestaande uit celdood en acute inflammatie, en de latere/chronische fase, bestaande uit de aanmaak van nieuwe cellen en heropbouw van het weefsel. Hieruit vloeien twee verschillende soort strategieën voor therapie: Allereerst het beschermen van het brein tegen celdood en inflammatie, oftewel "neuroprotectie" en vervolgens het stimuleren van heropbouw, oftewel "neuroregeneratie". Omdat potentiële therapieën tot dusver slechts partieel herstel geven van neonatale hersenschade, zal de toekomstige behandelstrategie in de kliniek gericht zijn op een combinatie van neuroprotectie en neuroregeneratie. Een voorbeeld hiervan is hypothermie (koelen van het brein, dit wordt reeds toegepast in de kliniek) voor het remmen van celdood in de acute fase en vervolgens het aanbieden van stamceltherapie voor het stimuleren van neuroregeneratie in de latere fase. Deze combinatietherapie zal in deze projectaanvraag worden getoetst. Omdat dit zowel een neuroprotectieve als neuroregeneratieve strategie betreft, achten wij het essentieel om de deelprojecten neuroprotectie en neuroregeneratie in één projectaanvraag te laten toetsen.

De drie beschreven diermodellen in deze projectaanvraag vertegenwoordigen drie verschillende patiëntengroepen met neonatale hersenschade. Zowel in de muis als in de mens wordt neonatale hersenschade veroorzaakt door inflammatie en/of zuurstoftekort. Het pathofysiologische mechanisme achter het ontstaan van de verschillende soorten neonatale hersenschade zijn dan ook overeenkomstig: een combinatie van celdood, excitotoxiciteit, productie van zuurstofradicalen en

inflammatie. De samenhang tussen deze verschillende diermodellen is dan ook erg groot, en het is veelbelovend om eenzelfde therapie te testen in de verschillende diermodellen. Het verschil tussen de drie soorten neonatale hersenschade is met name gebaseerd op het ontwikkelingsstadium waarin het brein zich bevindt op het moment van het insult. Dit zorgt voor uiting van schade in andere breindelen (bijv. grijze stof of witte stof) en/of in andere celtypes (bijv. neuronen of oligodendrocyten). Het uitblijven van een effect op bijvoorbeeld neuronale schade sluit niet per definitie een effect op witte stof schade uit. Om deze reden worden er geen GO/No-GO's ingebouwd tussen de verschillende diermodellen voor neonatale hersenschade en worden deze in parallel uitgevoerd.

De drie diermodellen voor neonatale hersenschade worden beschreven in bijlage 1 en 2. Er is bewust gekozen om de eerste twee diermodellen te bundelen onder één bijlage, omdat de technische handelingen overeenkomen en slechts verschillen in leeftijd van interventie, waardoor toetsing van ongerief gelijk is. Omdat het pathofysiologische mechanisme achter het ontstaan van de verschillende soorten neonatale hersenschade overeenkomstig is, kan de kennis uit de *in vitro* experimenten met de cellen uit Bijlage 3 gebruikt worden voor alle drie de diermodellen (uit bijlage 1 en 2) en deze kennis dient als primaire GO/NoGO's voor het al dan niet uitvoeren van een *in vivo* experiment (uit bijlage 1 en 2). Het uit elkaar trekken van de projectaanvraag op basis van diermodel, zorgt in onze ogen voor onduidelijkheid met betrekking tot de GO/NoGO's, die dan verschillende projectaanvragen zullen overlappen.

### Antwoord DEC Utrecht op Opmerking 1 (naar CCD op 15 december 2016)

Geachte [REDACTED]

Graag wil de DEC ook reageren op uw eerste punt als volgt.

De DEC heeft uitvoerig met de aanvrager gecorrespondeerd over de kwestie die u aansnijdt in uw eerste vraag. Dit blijkt uit de vragen en antwoorden die integraal zijn opgenomen in het advies van de DEC. De aanvrager heeft toch de keuze gemaakt om de verschillende deelprojecten en subdoelstellingen niet onder te brengen in aparte aanvragen. De DEC heeft daarmee uiteindelijk ingestemd. Voor de vraag waarom de DEC dat gedaan heeft verwijzen wij u naar deel C1 van het advies. Van alle experimenten is zonder meer aannemelijk gemaakt dat ze bijdragen aan het zelfde uiteindelijke doel dat ontegenzeggelijk van groot belang is: voorkomen of herstellen van hersenschade bij pasgeborenen. Alle deelprojecten en experimenten zijn zeer transparant beschreven en tot in detail toetsbaar. Ook is van elk onderdeel toetsbaar wat het nut van dat onderdeel is in het licht van het geheel. De DEC heeft zich gerealiseerd dat sommige delen van de aanvraag los van elkaar of parallel uitgevoerd kunnen worden, zonder dat de resultaten daarvan invloed hebben op de wijze van uitvoering van andere delen. De DEC heeft uiteindelijk geoordeeld dat, door de transparantie van het geheel, een ethische toetsing van het project waarin recht gedaan wordt aan de belangen van alle betrokken dieren, mogelijk is. De DEC twijfelde niet aan het belang, aan de kundigheid en vaardigheid van de onderzoekers en aan de kwaliteit van de opzet van dit onderzoek in proefdierkundig opzicht. Een verdere opsplitsing van de aanvraag in meerdere losse aanvragen zou er toe leiden dat de adviezen van de DEC over die losse aanvragen in elk geval voor wat betreft de ethische afweging gelijkloidend zouden zijn. In dat opzicht dient het splitsen van de aanvraag geen redelijk doel. De DEC neemt namelijk aan dat de redenen om een bepaalde definitie van het begrip project te stipuleren, gelegen zijn in het feit dat men die projecten (ethisch) toetsbaar wil houden.

Voor wat betreft de punten 2 en 3 is de DEC van oordeel dat het aan de aanvrager is om daarop te reageren.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]  
Secretaris DEC Utrecht

## Opmerking 2

*In de bijlage dierproeven 3 bent u van plan embryo's in te zetten. Hoewel dieren pas na de geboorte als proefdieren geregistreerd, zijn ze volgens de wet in het laatste trimester van zwangerschap als dierproeven. Daarom moeten de embryo's apart in de aanvraag en in de vergunning worden aangegeven. We verzoeken u het aantal embryo's dat in bijlage 3 wordt ingezet los van hetaantal pups aan te geven.*

## Antwoord 2

Wij danken de CCD voor deze informatie en hebben op verzoek het aantal embryo's en het aantal pups los aangegeven in Bijlage 3 en de NTS, zoals hieronder omschreven:

### Bijlage 3:

"... Uit eerdere experimenten weten we dat we uit 10 breintjes voldoende cellen kunnen isoleren voor 1 in vitro experiment van 50-100 welletjes van de desbetreffende cellen. Om alle in vitro vragen te kunnen beantwoorden in deze projectaanvraag, verwachten de komende jaren per jaar 10 in vitro experimenten uit te voeren met muizen en 10 experimenten met ratten, waarvan elk 9 met pups en 1 met embryo's. Om deze experimenten uit te voeren zijn voor 5 jaar: 9 experimenten x 10 pups x 5 jaar = 450 muizenpups en 450 rattenpups nodig. Daarnaast zijn voor deze experimenten: 1 experiment x 10 embryo's x 5 jaar = 50 muizenembryo's en 50 rattenembryo's nodig."

### NTS:

"Naar schatting zullen wij gedurende 5 jaar maximaal 5232 muizen gebruiken, waarvan 742 moeders, 4440 nakomelingen en 50 embryo's.

Daarnaast zullen we naar schatting gedurende 5 jaar maximaal 3166 ratten gebruiken, waarvan 331 moeders, 2785 nakomelingen en 50 embryo's."

## Opmerking 3

*Het aantal dieren uit bijlage 3 is niet in het totaal aantal dieren in de NTS opgenomen. We verzoeken u de NTS aan te passen.*

## Antwoord 3

Wij danken de CCD voor het corrigeren van de onjuiste dieraantallen in de NTS. We hebben de NTS als volgt aangepast:

### NTS:

"Naar schatting zullen wij gedurende 5 jaar maximaal 5232 muizen gebruiken, waarvan 742 moeders, 4440 nakomelingen en 50 embryo's.

Daarnaast zullen we naar schatting gedurende 5 jaar maximaal 3166 ratten gebruiken, waarvan 331 moeders, 2785 nakomelingen en 50 embryo's."

We hopen u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd en kijken uit naar uw antwoord.

Met vriendelijke groeten,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**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

AVD115002016751

**Bijlagen**

1

Datum 1 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 21 november 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 11 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de samenhang van de proeven nader onderbouwd en het aantal embryo's duidelijk in de aanvraag aangegeven. Daarnaast heeft u uw Niet-technische samenvatting aangepast.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Met het oog op artikel 10a, lid 1, zijn er algemene voorwaarden gesteld.

U kunt met uw project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 februari 2017 tot en met 1 december 2021. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dec Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 november 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Datum:**  
1 februari 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD115002016751

#### **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 nummers in de rechter kantlijn in deze brief.

Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven  
naam: [REDACTED]

ir. G. de Peute,  
Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

**gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven**

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 februari 2017 tot en met 1 december 2021, voor het project "Bescherming en herstel van het beschadigde neonatale brein" met aanvraagnummer AVD115002016751, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dec Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 21 november 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 november 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 januari 2017;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 november 2016, ontvangen op 21 november 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 11 januari 2017



**Aanvraagnummer:**  
AVD115002016751

| Naam proef  | Diersoort/ Stam                       | Aantal dieren | Ernst                        | Opmerkingen  |
|---|---------------------------------------|---------------|------------------------------|--|
| <b>3.4.4.1 Hypoxische-ischemische hersenschade in voldragen en te vroeg geboren baby's (doelgroep 1 en 2)</b> |                                       |               |                              | 3990 muizen pups en 732 zogende moedermuizen; 750 ratten pups en 104 moederratten.   |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /      | 4.722         | 68%<br>Matig<br>32%<br>Licht |  |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / | 854           | 68%<br>Matig<br>32%<br>Licht |  |
| <b>3.4.4.2 Diffuse witte stof hersenschade zonder focale laesies in te vroeg geboren baby's (doelgroep 3)</b> |                                       |               |                              | 1585 pups en 219 moeders   |
|   | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / | 1.804         | 70%<br>Matig<br>30%<br>Licht |  |
| <b>3.4.4.3 Neuronale en gliale cellen voor primaire celweek</b>   |                                       |               |                              | 450 muizenpups, 10 zogende moedermuizen en 50 muizenembryo's; 450 rattenpups, 8 zogende moederratten en 50 rattenembryo's; |
|   | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) /      | 510           | 100%<br>Licht                |  |



**Aanvraagnummer:**

AVD115002016751

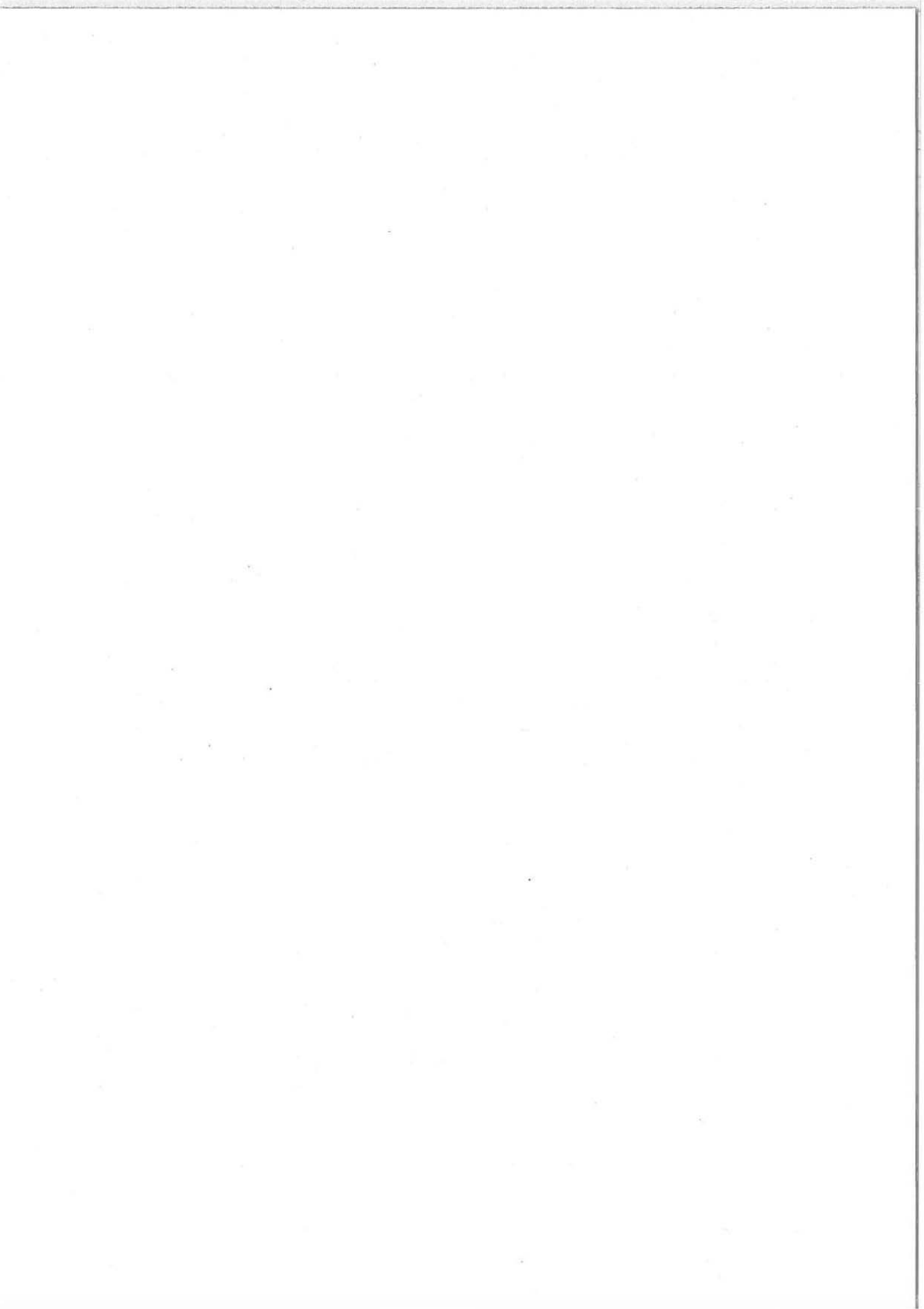
|  |                                       |     |               |  |
|--|---------------------------------------|-----|---------------|--|
|  | Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / | 508 | 100%<br>Licht |  |
|--|---------------------------------------|-----|---------------|--|

**Voorwaarden**

*Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet op de dierproeven zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen*

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a 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 afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.





**Aanvraagnummer:**

AVD115002016751

## 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 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

**Aanvraagnummer:**

AVD115002016751

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

**Einde van een dierproef**

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

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

Uit artikel 13d 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 13c 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.

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.