

Inventaris Wob-verzoek W17-07									
nr.	document NTS2016794	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 initieel				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 1 aangepast				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x		
7	Ontvangstbevestiging				x		x		
8	Verzoek om nadere aanvulling CCD				x		x		
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				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, of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academisch Medisch Centrum
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	343362777
		Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68TABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	AMC Crediteurenadministratie
		(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
		(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	Functie	Postdoc
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
		(Titel) Naam en voorletters	[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 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 | 01 - 01 - 2017 |
| Einddatum | 01 - 01 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van darmbacteriën in de ontwikkeling van diabetes en overgewicht
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------------------------|
| Naam DEC | Dierexperimentencommissie AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31, 1105AZ Amsterdam |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur


5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening


- 12 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 Amsterdam

Datum 16 - 12 - 2016

Handtekening 



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | | |
|--|---|
| 1. Vul uw
1 deelnemernummer van | 11800 |
| 1. Vul de naam van de
2 instelling of organisatie | AMC |
| 1. Vul de titel van het
3 project in. | Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2. In welke categorie valt
1 het project. | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek |
| <i>U kunt meerdere
mogelijkheden kiezen.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie |
| | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van |
| | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort |
| | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding |
| | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek |
| | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

3 Algemene projectbeschrijving ...

3.1 Achtergrond

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

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

Introduction

Obesity is a predisposing factor for development of chronic diseases such as cardiovascular disease (CVD) and type 2 diabetes (T2DM). These diseases are major causes of morbidity and mortality and carry significant economic burden. Strategies to reduce obesity and obesity-related diseases are therefore urgently needed. This project proposal will focus on obesity and T2DM.

Both the industrialized and developing world have experienced an obesogenic shift in lifestyle induced by increased caloric intake and reduced caloric output. Although weight-loss is an effective means to reduce the insulin resistant phenotype in early T2DM in the obese, it is difficult to achieve long-term life style changes to maintain a healthy body weight [1]. The development of obesity and progression to T2DM is complex and multifactorial: it is highly subject to individual (genetic) susceptibility and environmental factors. In line, a subpopulation of obese humans never develops metabolic pathologies like T2DM at all. An imbalance between intake and output of energy therefore does not fully capture the complex mechanisms underlying the development of T2DM in obesity. Obesity-induced inflammatory changes, especially in white adipose tissue, have been postulated to play a crucial part in the pathophysiology of obesity and T2DM. Factors mediating these inflammatory changes are largely unknown. In recent years, the gut microbiota has been put forward as factor that contributes to such inflammatory changes.

Microbiota-mediated development of obesity and T2DM

In the past decade, it became evident that the intestinal microbiota plays a significant role in the development of metabolic pathologies including obesity and T2DM. A reduced number of bacterial genes (bacterial richness) in the intestine with a concomitant increase in inflammatory profile [2, 3] and increased circulating levels of bacterial 16s rDNA [4] have been suggested to have predictive value for development of obesity-associated insulin resistant state in humans. Evidence for a causal role of the microbiota came from observations that colonization of *ad libitum*-fed, germ-free mice with microbiota from obese (murine or human) donors increased weight gain to a higher extent compared to colonization with microbiota from lean (murine or human) donors [5, 6]. In line with these observations,

Although several intestinal bacterial species have been correlated with obesity, increased fasting blood glucose levels, increased HbA1c levels and development of insulin resistance (all precursors of T2DM), it is not yet clear whether these bacteria are causal to or a result of these metabolic disturbances.

inflammatory pathways, in particular in visceral adipose tissue. This in turn contributes to development of insulin resistance. Other (Gram-negative) bacteria or bacterial products might do the same but this has as yet not been investigated.

Unknowns: The identity of bacteria and/or bacterial products that causally influence host metabolism (*e.g.*, body weight, glucose tolerance, insulin sensitivity).

Microbiota-mediated effects on gut barrier function and bacterial translocation

Migration of bacteria and/or bacterial metabolites from the intestine into the periphery (defined as bacterial translocation) have recently been suggested as a potential link between activation of (peripheral) inflammatory pathways and subsequent development of insulin resistance [9, 10]. Nevertheless, the extent to which bacteria are capable to translocate from the intestinal lumen into otherwise sterile peripheral tissues remains to be determined. Moreover, it is currently unknown if bacterial DNA, as detected in adipose tissue, circulation and liver of obese and T2DM mouse models and human subjects, is derived from alive bacteria or whether it is derived from bacteria that have been ingested by immune cells in lymph nodes in tissues surrounding the intestine.

Conditions that favor or prevent translocation of bacteria or bacterial metabolites will be important to understand the process and to develop means to improve intestinal barrier function in obese and T2DM patients. We hypothesize that an altered microbiota composition, as observed in obesity and T2DM, may directly affect intestinal epithelial permeability by 'loosening' the epithelial cells lining the intestine. Bacteria and bacterial metabolites may also affect specific cell types that preserve intestinal barrier function such as Paneth and Goblet cells. These cells can be considered intestinal gate keepers and a decreased function, as observed in obese humans and mice, has been associated with increased bacterial translocation, intestinal dysfunction and development of disease (*e.g.*, inflammatory bowel disease, potentially diabetes) [11-14].

Unknowns: The mechanism by which bacteria or bacterial metabolites affect intestinal barrier function and augment translocation from the intestinal lumen to the circulation and peripheral tissues (*e.g.*, adipose tissue and liver).

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

The overall aim of this project proposal is to obtain mechanistic insight in the role of the gut microbiota in development of obesity and T1DM (see 3.1 for background information). We will specifically focus on:

- Microbiota-mediated development of obesity and TIIDM
- Microbiota-mediated effects on bacterial translocation and gut barrier function

Experiments suggested in this project proposal will provide data on these specific focus points. Both focus points are highly related and will –when combined- provide a complete picture of the overall aim. Using ‘Go’ and ‘No-go’ criteria (as described in 3.4.3.) will allow for a focused approach of the research aim and facilitates efficient use of mice.

Feasibility

This project is a continuation of an existing line of research [REDACTED]. Within [REDACTED] there is sufficient knowledge on successful execution of experiments with animal models enabling us to successfully test our hypotheses and conclusively address our research questions.

The project proposal is feasible within the suggested 5-year time frame. Mouse numbers for suggested experiments are on average ~30 mice/month for 5 years which is manageable with the manpower we have for the coming 5 yrs [REDACTED]

3.3 Belang

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

The obesity pandemic drives the development of medical conditions such as TIIDM. Obesity and TIIDM are leading causes of morbidity and mortality worldwide with estimated costs exceeding 400 billion euro over the past 5 years and an estimated 250,000 deaths each year [15, 16]. It is predicted that by 2050, an alarming one in three people worldwide will be diagnosed with TIIDM [17].

The development of obesity and progression to TIIDM is complex and multifactorial (*e.g.*, driven by both genetic and environmental factors). Long-term life style changes aiming to maintain a healthy body weight have been proven ineffective [1]. Development of strategies to prevent, treat and cure obesity and related comorbidities therefore has high priority. Mechanistic insight in processes that contribute to development of obesity and TIIDM is important in this quest.

The gut microbiota plays an important role in maintaining host health. Alterations in gut microbiota composition are at the basis of several metabolic pathologies, including obesity and TIIDM [18, 19]. Research on the role of the gut microbiome in health and disease has gained significant attention and effort in the past decade. Although there is evidence for a contributing role of the microbiota in development of obesity and TIIDM (see section 3.1, description of the framework of this project proposal), studies providing mechanistic insight in this relation are still scarce. Additionally, it remains to be determined if changes in microbiota composition *per se* are enough to develop these pathologies or whether additional triggers such as diet, host inflammatory response or host genetic make-up are additional requirements to develop obesity and TIIDM in mice and men.

Data obtained from the experiments proposed in this project proposal will provide mechanistic insight in microbiota-mediated changes in intestinal barrier function, bacterial

Intervention strategy for elimination of specific bacterial strain

Methods that aim to specifically eliminate unfavorable bacteria [REDACTED] from the intestine will be a valuable tools to study the effect of elimination of a particular bacterium from the intestine on development of obesity and insulin resistance. Additionally, such methods might in the future be developed into successful treatment options for microbiota-related diseases in humans. Antibiotics treatment is usually the method of choice to eliminate bacteria. However, antibiotics rarely have specific action against particular bacterial species. Furthermore, antibiotics severely affect the entire gut microbiota community (sometimes chronically) and long-term antibiotics use can lead to antibiotics resistance.

Bacteriophages are viruses that infect and eliminate bacteria in a species-specific manner. Since bacteriophages do not target eukaryotic cells, they are a safe option for use in humans [20]. As such, they have been used as an FDA-approved method to kill *Listeria* bacteria on food products (U.S. FDA/CFSAN: Agency Response Letter, GRAS Notice No. 000218). In Eastern Europe, bacteriophages have successfully been used for over 90yrs to treat antibiotic-resistant infections [21, 22]. Additionally, bacteriophages can be modified (engineered) in such a way that they maintain their specific infectious capacity with subsequent elimination of the target bacterium without being able to replicate. This way, bacteriophages can be dosed rather specifically and used in a manner that prevents potential response of the host to bacteriophages. We will use bacteriophages as a tool to study the effect of elimination of a particular bacterial species from the gut on intestinal barrier function and development of obesity and TIIDM.

Strategy for administration of compounds that affect intestinal barrier function:

As stated in the introduction, bacteria might directly affect intestinal epithelial permeability by 'loosening' the epithelial cells lining the intestine through yet unknown mechanisms. Additionally, they may affect specific cell types that preserve intestinal barrier function such as Paneth and Goblet cells. One of the mechanisms underlying decreased Paneth and Goblet cell function in obesity and TIIDM is endoplasmic reticulum (ER) stress [23]. This specific form of organelle stress, which is increased in many cell types (*e.g.*, hepatocytes, adipocytes, intestinal epithelial cells, Paneth cells and Goblet cells) in obese humans and mice compared to lean humans and mice, leads to severe metabolic dysfunction of these cells [24] and potentially reduces intestinal barrier function.

Interventions that alter epithelial, Paneth or Goblet cell function (*e.g.*, by administering 'probiotics' that promote growth of bacteria that maintain healthy epithelial function or by administering ER stress reducing compounds), and thereby improve intestinal barrier function and ameliorate development of obesity and insulin resistance, are of interest in this project proposal.

Strategy for choice of diet:

Dietary composition is an important contributor to development of obesity and TIIDM. To clarify whether dietary composition is a prerequisite for microbiome-mediated development of obesity and TIIDM or whether administration of bacteria can induce obesity and TIIDM without the requirement of a specific dietary composition, we will perform experiments in mice fed different diets (*e.g.*, chow or high-fat diet).

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

Mice will be administered selected bacterium or bacterial metabolite and subjected to dietary regimens (e.g., chow vs high-fat diet). An alternative approach would be to eliminate bacterium of interest using bacteriophages directed against a bacterium of interest. Primary *in vivo* readouts of interest are effects of the intervention on body weight, glucose tolerance and insulin sensitivity. Intestinal barrier function will be assessed after termination of the mice.

Microbiota-mediated development of obesity and T1DM

Following Go/No-Go decision making (see 3.4.3), we will then carry out dedicated studies to unravel the mechanism by which the intervention influences metabolic processes that are typically deranged in obesity and T1DM.

- **lipid production.** Hepatic or intestinal lipid production is typically deranged in obesity and T1DM and severely increases the chance to develop cardiovascular disease (CVD, a major comorbidity in T1DM) and fatty liver disease in humans. Additionally, it has been suggested that bacteria or bacterial compounds (especially LPS) have high affinity for lipids and might translocate with lipids in the intestine into the body.
- **energy metabolism** Alterations in microbiome composition and function have been associated with changes in energy homeostasis. Certain microbiota can increase energy harvest from food which potentially contributes to increased weight gain.
- **cholesterol metabolism** Cholesterol homeostasis is often deranged in obesity and T2DM. Increased LDL-cholesterol levels increase the chance to develop cardiovascular disease (CVD, a major comorbidity in T1DM). The intestine plays a crucial role in whole body cholesterol homeostasis and bacteria and their metabolites have been shown to affect cholesterol levels in the body.
- **bile salt metabolism** In addition to their function as an intestinal soap – dissolving dietary lipids- bile salts are signaling molecules that play a regulatory role in glucose and lipid metabolism. Bacteria in the intestine can metabolize and convert bile salts: bile salt composition is therefore in great part determined by the gut microbiota.
- **insulin sensitivity** Although we assess insulin-mediated glucose clearance, the hyperinsulinemic euglycemic clamp is the gold standard for studying insulin sensitivity *in vivo*. This test allows for analysis of insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and insulin-mediated uptake of glucose in the periphery.

Experiments that assess these metabolic processes will provide insight in the physiological effect of the intervention on metabolic pathways involved in development of or that are affected by obesity and T1DM.

Microbiota-mediated effects on bacterial translocation and gut barrier function

Following Go/No-Go decision making (see 3.4.3), we will carry out dedicated *in vivo* studies to unravel the mechanism by which the intervention influences intestinal permeability and routes by which the bacteria enter the periphery.

We will assess the effect of the intervention on intestinal barrier function and translocation of bacteria by:

- **Intestinal permeability assays** Intestinal permeability will be assessed using a fluorescent polysaccharide or (fluorescently) labeled bacteria that can be traced in several tissues/organs.
- **Lymph duct cannulation** Following translocation across the intestinal epithelium, bacteria can enter the body through the portal system or via the lymphatic system. To assess the latter, we will collect and analyze (labeled) bacteria in lymph fluid.

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.

The overall aim and specific focus points in this project are closely related: altered gut microbiota composition has been shown by us and others to contribute to development of obesity and TIIDM. Data on causality, however, are scarce. We hypothesize that microbiota contributes to development of obesity and TIIDM by favoring translocation of bacteria or bacterial metabolites from the intestine to peripheral tissues. This hypothesis is translated in the two focus points (see 3.1 and 3.2).

Since the experiments that address the focus points cannot be carried out in one mouse experiment, we designed a series of experiments aiming to answer the specific focus points.

This approach also provides the opportunity to create 'Go' and 'No-go' criteria thereby preventing carrying out unnecessary procedures.

Go and No-Go stepwise approach:

1) Design intervention

Intervention of interest will be determined based on human data (see strategy 3.4.1).

2) Start intervention

Since we work in the framework of obesity and TIIDM, one of the first criteria is that the intervention has to have a significant effect on one of the key parameters of obesity and TIIDM development (*i.e.*, **Primary outcome parameters**, these are body weight, glucose tolerance en insulin sensitivity).

Based on the results of the primary outcome parameters, we will decide whether or not to continue with an intervention:

No-go → none of the primary interventions were changes following intervention. Do not continue this intervention. Follow-up animal experiments will not be carried out. Redesign intervention (*e.g.*, choose other bacterium/intervention)

Go (and milestone!) → one of the primary outcome parameters is affected by the intervention. We consider this a Go and mechanistic studies will be performed.

3) Use intervention for mechanistic studies

Based on results of primary outcome parameters, we can prioritize a follow-up mechanistic study. For example, in case of

Altered body weight? Then energy metabolism analysis might have priority

Altered insulin sensitivity? Then hyperinsulinemic clamp might have priority

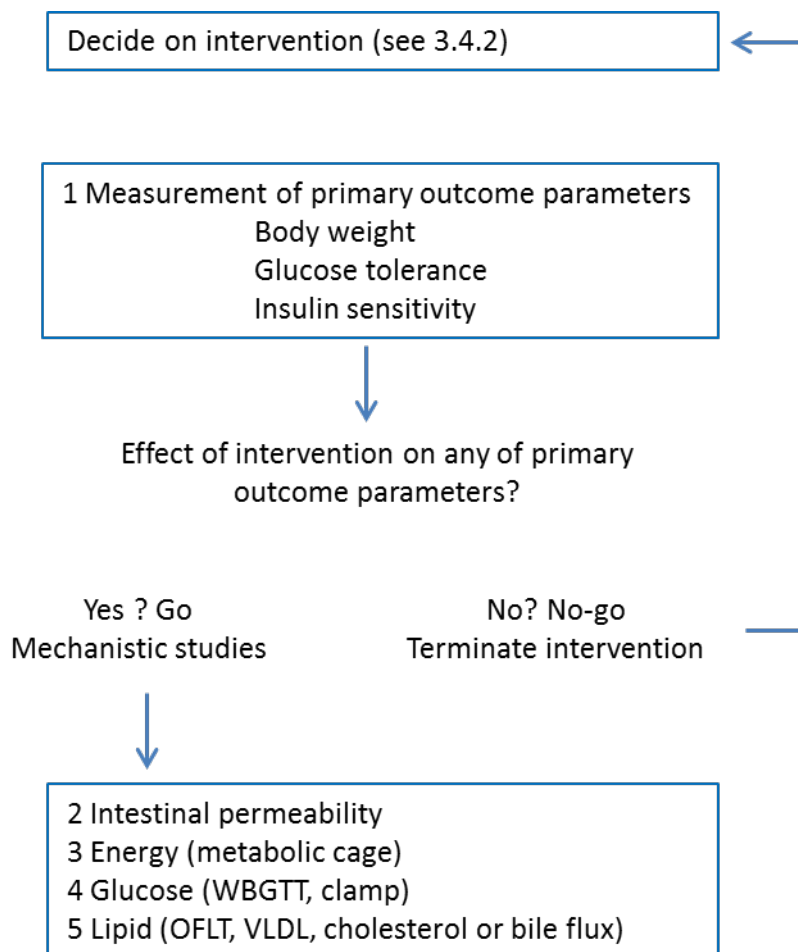


Figure 1. Summary of Go and No-go approach. The numbers in this flow scheme correspond

with the animal experiments described in Appendix 1.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation

References

1. Friedman, J.M., *Modern science versus the stigma of obesity*. Nat Med, 2004. **10**(6): p. 563-9.
2. Cotillard, A., et al., *Dietary intervention impact on gut microbial gene richness*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 585-8.
3. Le Chatelier, E., et al., *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*. Nature, 2013. **500**(7464): p. 541-6.
4. Amar, J., et al., *Involvement of tissue bacteria in the onset of diabetes in humans: evidence for a concept*. Diabetologia, 2011. **54**(12): p. 3055-61.
5. Ridaura, V.K., et al., *Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice*. Science, 2013. **341**(6150): p. 1241214.
6. Turnbaugh, P.J., et al., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1027-31.
7. [REDACTED]
8. Alang, N. and C.R. Kelly, *Weight gain after fecal microbiota transplantation*. Open Forum Infect Dis, 2015. **2**(1): p. ofv004.
9. Cox, A.J., N.P. West, and A.W. Cripps, *Obesity, inflammation, and the gut microbiota*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015. **3**(3): p. 207-15.
10. Lam, Y.Y., et al., *Role of the gut in visceral fat inflammation and metabolic disorders*. Obesity (Silver Spring), 2011. **19**(11): p. 2113-20.
11. Biswas, A., et al., *Induction and rescue of Nod2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14739-44.
12. Johansson, M.E., J.M. Larsson, and G.C. Hansson, *The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108 Suppl 1**: p. 4659-65.
13. Mankertz, J. and J.D. Schulzke, *Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. **23**(4): p. 379-83.
14. Teltschik, Z., et al., *Intestinal bacterial translocation in rats with cirrhosis is related to compromised Paneth cell antimicrobial host defense*. Hepatology, 2012. **55**(4): p. 1154-63.
15. Cecchini, M., et al., *Tackling of unhealthy diets, physical inactivity, and obesity: health effects and cost-effectiveness*. Lancet, 2010. **376**(9754): p. 1775-84.

16. Neeland, I.J., et al., *Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults*. JAMA, 2012. **308**(11): p. 1150-9.
17. Boyle, J.P., et al., *Projection of the year 2050 burden of diabetes in the US adult population: dynamic modeling of incidence, mortality, and prediabetes prevalence*. Popul Health Metr, 2010. **8**: p. 29.
18. Sekirov, I., et al., *Gut microbiota in health and disease*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 859-904.
19. Tremaroli, V. and F. Backhed, *Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism*. Nature, 2012. **489**(7415): p. 242-9.
20. Abedon, S.T., et al., *Phage treatment of human infections*. Bacteriophage, 2011. **1**(2): p. 66-85.
21. Summers, W.C., *Bacteriophage therapy*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 437-51.
22. Trudil, D., *Phage lytic enzymes: a history*. Virol Sin, 2015. **30**(1): p. 26-32.
23. Hodin, C.M., et al., *Reduced Paneth cell antimicrobial protein levels correlate with activation of the unfolded protein response in the gut of obese individuals*. J Pathol, 2011. **225**(2): p. 276-84.
24. Lee, J. and U. Ozcan, *Unfolded protein response signaling and metabolic diseases*. J Biol Chem, 2014. **289**(3): p. 1203-11.



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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	<input type="text" value="11800"/>	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	<input type="text" value="AMC"/>	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation"/>

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimental approach:

Mice will be administered with selected bacterium or bacterial metabolite and subjected to dietary regimens (*e.g.*, chow vs high-fat diet). An alternative approach would be to eliminate bacterium of interest using bacteriophages directed against selected bacterium. **Primary outcome parameters** are body weight, glucose tolerance and insulin sensitivity (as assessed by procedures 1a-d described below).

Secondary outcome parameters Tissues will be analyzed after termination of the experiment (*e.g.*, bacterial DNA content in tissues, expression of proteins and genes involved in glucose and energy metabolism).

Following Go-No Go decision making (*i.e.*, if one of the primary outcome parameters is affected, see 3.4.3 Project proposal), we will carry out dedicated studies to further unravel the mechanism by which the intervention influences metabolic processes that are typically deranged in obesity and TIIDM (procedures 3 – 5). Additionally, dedicated experiment assessing intestinal permeability will be carried out (procedure 2)

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.

Procedures and justifications (J):

Supplementation or removal of bacteria.

Bacteria or bacterial metabolites will be supplemented or removed (using bacteriophages) by gavage (orogastric administration). This will require careful restraining of the mice. **(J)** Precise dosing is crucial and bacteria/bacteriophages are very sensitive to environmental exposure (e.g., cannot be exposed to oxygen) and have to be administered locally.

1 Measurements of primary outcome parameters:

a) body weight

Mice will be weighed throughout the experimental period. **(J)** It is of critical importance to closely monitor body weight in all experiments. This indicates overall health of the mice and is a crucial determinant for development of obesity.

b) Glucose tolerance testing (GTT) and Insulin tolerance testing (ITT)

Mice will be fasted prior to these tests. Blood glucose will be measured from the tip of the tail using a glucometer prior to an intraperitoneal (ip) injection or oral bolus of glucose. Subsequently, blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after glucose administration. **(J)** This test gives a rapid and validated estimation of whole body glucose responsiveness. After recovery the same mice can be used for an ITT; Blood glucose will be measured from the tip of the tail prior to an ip injection of insulin. Blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after insulin administration. **(J)** This test provides a validated estimation of whole body insulin responsiveness without requirement of invasive surgical procedures.

c) Tissue collection

After **a-c** have been performed, mice will be anesthetized. Tissues and organs will be removed and snap frozen in liquid nitrogen or processed according to requirements of further analysis. *Ex vivo* analysis of tissues (e.g., lipid analysis, bacterial rDNA analysis, histology, cytokine profiling, FACS analysis, protein and gene expression analysis), will **(J)** provide mechanistic insight in regulatory pathways that coordinate *in vivo* observations.

Cumulative discomfort: "licht"

Power analysis performed by us in previous mouse studies usually suggests using around 10 mice per group to obtain relevant differences in insulin sensitivity and glucose tolerance.

Group size: (based on unpublished data) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 20%, standard deviation: 16% -> 10 animals per group.

2) Intestinal permeability

FITC-dextran, D-Xylose or fluorescently labeled bacteria are examples of compounds that allow for analysis of passage of molecules (either in between intestinal cells or through intestinal cells, respectively). Mice will be fasted prior to receiving an oral bolus of such a compound. Blood will subsequently be collected at several time intervals after administration. During termination of the

mice a large blood sample will be collected in which, apart from permeability markers, also blood lipids can be measured. **(J)** Translocation of FITC-dextran or D-Xylose from the intestine into the blood stream is a measure of intestinal permeability and reflects gut barrier function.

Mice will be anesthetized and the common mesenteric lymph duct will be exposed by removal of surrounding tissues. A small catheter will be inserted into the lymph duct through a small incision and fixed to the lymph duct using tissue glue. Mice will remain anesthetized throughout the experiment and will receive an analgesic. Lymph will be collected at several time intervals after start of the experiment. After collection of the last sample, mice will be terminated. **(J)** Collected lymph will be analyzed for lipid content, presence of bacteria and immune cells. We hypothesize that translocated bacteria or bacterial products enter the system via the lymphatic system. This procedure will provide crucial insight in the route of bacterial entrance into the system.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

3 Energy homeostasis

Metabolic cages

Whole body energy metabolism will be assessed using an open circuitry calorimetric system (PhenoMaster system) or comparable device. Mice will be single housed in and habituated to the cages prior to the start of the analysis. Individual food intake will be assessed. **(J)** Alterations in microbiome composition have been associated with changes in energy homeostasis. Metabolic cages allow for sensitive analysis of energy homeostasis in a minimally invasive manner.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 20% -> 10 animals per group

4 Glucose/insulin homeostasis

4a) Whole body glucose tolerance test

Mice will be fasted prior to the test. Mice are injected intraperitoneally with a low dose of stable isotope-labeled glucose. Before and every 30 minutes for 6 hours, blood glucose concentrations are measured in blood through tail-tip bleeding. At the same time points, blood spots are taken on filter paper. After the test a blood sample will be taken from the tail vein. **(J)** This test monitors glucose homeostasis under basal conditions and has the advantage that mice are not terminated after the test but can be reused for other tests. (Please note that this test differs from the test described in **1b**)

4b) Hyperinsulinemic euglycemic clamp

Mice will be equipped with a jugular vein cannula that allows for non-invasive administration of solutions in awake mice. In short, mice will be anesthetized and a cannula will be inserted and fixed into the jugular vein. The free end of the cannula will subsequently be tunneled to a small incision in the neck. The cannula will be attached to the skull using acrylic glue. Mice will be administered an analgesic and allowed to recover for 3-6 days prior to infusion experiments. After placement of the jugular vein cannula, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the cannula or stitches.

Mice will be fasted prior to the test. Mice will be infused with solutions containing insulin and/or

glucose (stable isotope-labeled). The infusion rate of the solutions will be adjusted to rates required to maintain euglycemia. Blood glucose will be measured from the tip of the tail at several time intervals. After the experiment, mice will be terminated by heart puncture under anesthesia. **(J)** The hyperinsulinemic euglycemic clamp is the gold standard for studying insulin sensitivity *in vivo*.

Cumulative discomfort of this (glucose) experimental setup: "matig"

Power analysis performed by [REDACTED] in previous mouse studies using this set up suggests 10-11 mice per group will be required to obtain relevant differences in tests **4a-b**.

Group size: [REDACTED] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 32%, standard deviation: 27% -> 11 animals per group.

5 Lipid homeostasis

Except for the oral fat load test (**a**), mice are terminated after measurements of lipid metabolism. Experiments below will therefore be carried out in separate cohorts of mice.

5a Oral fat load test (OFLT)

Mice will be fasted prior to the test. Blood will be drawn prior to oral administration of corn oil. To prevent rapid lipid turnover an inhibitor of lipolysis will be administered as well. Subsequent blood samples will be collected at several time points after corn oil administration. **(J)** Lipid concentration in the plasma will be used as a measure of intestinal lipid uptake. Additional analysis of the collected blood samples will reveal insight in postprandial endotoxemia (*i.e.*, co-translocation of LPS or bacteria with lipids).

5b Very Low Density Lipoprotein (VLDL) production

Mice will be fasted prior to this experiment. Blood will be drawn prior to administration of a lipase inhibitor that prevents break down of lipids in the circulation. Subsequent accumulation of lipids in the blood is a measure for lipid production by the liver. Blood will subsequently be collected at several time intervals. Immediately after collection of the last blood sample, mice will be terminated and a large blood sample will be collected. **(J)** Enhanced hepatic lipid secretion (in the form of VLDL-triglycerides) is an important hallmark of obesity and diabetes. Changes in VLDL secretion following bacterial interventions will therefore be a read out of insulin sensitivity.

Cumulative discomfort: "matig" **5a+b**

Group size: [REDACTED] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 32%, standard deviation: 27% -> 11 animals per group.

5c Cholesterol flux

Mice will be administered with stable (non-radioactive) isotopes of cholesterol. Blood will be collected at several time points after administration. At the end of the experiment, mice will be submitted to bile duct ligation to collect bile (a major exit route of cholesterol from the body is via bile). Mice will be terminated by heart puncture and tissues/organs will be collected for further analysis of stable isotope enrichment. **(J)** The intestine plays a crucial role in whole body cholesterol homeostasis. This flux analysis allows us to determine *in vivo* cholesterol turnover and contribution of several body compartments to cholesterol homeostasis when microbiome composition/immune system has been altered.

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: (Boesjes et al 2014 PloS One) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

5d Bile salt flux

Mice will be intravenously administered with a stable (non-radioactive) isotope-labeled bile salt. Blood will be collected at several time points after administration. At the end of the experiment, mice will be submitted to bile duct ligation to collect bile and subsequently terminated. **(J)** Bile salt composition is in great part determined by the gut microbiota. In addition to *ex vivo* determination of bile salt composition in several compartments (*e.g.*, feces, plasma), flux analysis of bile salts (*e.g.*, of cholate) *in vivo* will demonstrate if altered microbiome composition affects bile salt turnover.

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: [REDACTED] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

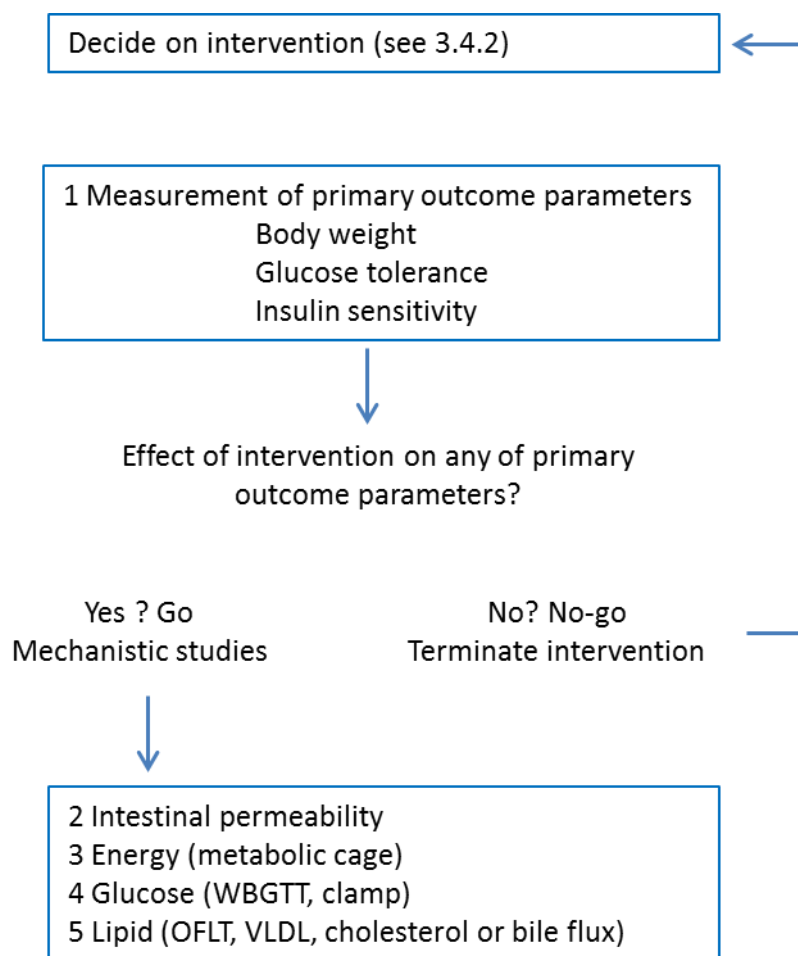


Figure 1. Summary of Go and No-go approach (see project proposal 3.4.3). Numbers in flow

scheme correspond with the animal experiments as indicated in the Appendix

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

Statistical groupsize calculation is used to minimize the total number of animals required (Van Lenth the American statistician 2001 Some practical guidelines for effective sample size determination). The extensive experience of our laboratory will be used in minimizing the required number of animals per group as much as possible. Animals will be followed up longitudinally and used to analyze multiple aspects of glucose, lipid and bile acid metabolism. Experiments are designed to extract the maximum amount of information out of each animal without causing unnecessary discomfort and discomfort beyond 'matig'. The number of animals required for these experiments are based on sample-size calculations using historical published and unpublished data from our laboratory, from our collaborators and from literature.

B. De dieren

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

Species: mouse

Origin: commercial providers, collaborating research groups

Age: adult mice (range ~4 and 20 weeks)

Gender: The experiments described in this proposal will only make use of male animals.
Reasons:

1) The objective and sub-goals do not include any aspect on gender. It is not within the scope of this proposed research to include the element of gender because it does not contribute to answering any of the sub-goals nor the objective. 2) Our main objective is to study the role of gut bacteria in development of obesity and type 2 diabetes. In order to do so, one of the requirements is to have a validated model (=male mice) that develop the pathology in standardized condition (eg, high-fat diet). Only under these conditions, it will be possible to study the additional role of bacteria. (Since female mice generally respond differently to HFD feeding compared to males (eg, female mice seem to be fairly protected from adipose tissue inflammation, glucose intolerance, hyperinsulinemia and islet hypertrophy), female animals are a less suitable model system. Use of female mice would require validation, optimization and standardization of all procedures. It is not within the scope of this proposed research (nor do we have the financial means or time to do so) to include the optimization and standardization of new animal models, new diets, new disease phenotypes, new measurement techniques and new surgeries.

Estimated numbers:

Since we cannot predict if bacteria/bacteriophages will be successful (as determined using methods described under Beoogde handlingen 1a-d), we will here assume that all interventions will be successful and therefore that all suggested experimental procedures will be carried out (all go).

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 1 will be 210, discomfort "licht":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) (10*3=30); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 (30*7=210)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 2 will be 273, discomfort "matig".

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 3 will be 231, discomfort "matig":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($10*3=30$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($30*7=210$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 4 will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5a+b will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5c will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5d will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

Estimated number of mice: 1701 mice (not corrected for HEP)

Maximum discomfort: "matig" (Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

945 mice (=55%) have discomfort 'matig'. A maximum of 10% of mice in this category might reach a HEP. We therefore calculate an additional 10% of mice for this category (=95 mice). The discomfort matig will therefore be 58%.

The total number of mice is $1701 + 95 = 1796$

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Reduce:

Several of the suggested procedures (e.g., OGTT/ITT/OFLT) can be carried out within one animal experiment thereby reducing animal numbers. Other experiments, however, require dedicated groups of mice because the procedure results in termination of the animal (e.g., euglycemic clamps, VLDL secretion, lipid fluxes). This unfortunately prevents the possibility to reuse the animal for additional experimental procedures. To maximize usage of materials (e.g., blood or tissues) collected, these will be available to collaborating research groups.

Using 'Go' and 'No-go' criteria (see section A), we will proceed (or not) with in-depth follow-up experiments and decide which experiments are required and which ones can be skipped. This allows for development of dedicated experiments thereby reducing the number of mice required to answer the scientific questions.

All procedures will be carried out by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce failure of experimental procedures (and thereby loss of animals).

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Refine:

Mice will be acclimated prior to the experiments. Except for metabolic cage experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the

animals.

Replace:

Methods aiming to reduce or replace suggested experiments include *in vitro* (in organoids or cell models) assessment of efficacy, safety and effect of bacteria and compounds of interest. Although these studies will be carried out prior to the animal experiments, they cannot yet fully replace studies that require multicellular, complex systems.

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.

We do not propose experiments that require materials that are damaging to the environment. We will make sure to order bacteria and compounds in amounts sufficient for the suggested experiments thereby reducing waste. Any leftover materials will be disposed of according to health and safety guidelines.

To reduce stress during the intervention, we would like to refer to our reduction points:

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Except for metabolic cage and hyperinsulinemic euglycemic clamp experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals. Inexperienced participants to the studies will receive training in dedicated animals (oefenprotocol) prior to joining the experiments.

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.

We have performed literature studies and are in close contact with research groups that work in the same field and have related research questions. We have no indications that the suggested experiments have been previously performed.

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.

Studies assessing energy metabolism require individual housing of the mice in metabolic cages that might contain a roster for a max of 5 days.

After placement of jugular vein catheter, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the stitches or catheter connection point.

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.

Anesthesia will be administered prior to surgical procedures and termination of the mice. Means: inhalation (e.g., isoflurane) or injection (e.g., Hypnorm and Diazepam,)

Analgesia will be administered after survival surgery and during surgery under anesthesia (e.g., lymph and bile cannulation). Means: injection: (e.g., Buprenorphine)

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We do not predict additional health deteriorations

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Criteria: weight loss (>10%/week), isolation, decreased locomotion, wounds, hunched back or diarrhea

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

<10% overall

K. Classificatie van ongerief

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

The highest inconvenience score of suggested experiments in this Appendix 1 is "matig", therefore the overall discomfort score will be 'matig'.

(Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

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.

Tissues/organs will be collected for subsequent analysis in the laboratory.

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.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	AMC				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">1</td> <td style="padding: 2px;">Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation
Volgnummer	Type dierproef					
1	Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation					

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.

Experimental approach:

Mice will be administered with selected bacterium or bacterial metabolite and subjected to dietary regimens (*e.g.*, chow vs high-fat diet). An alternative approach would be to eliminate bacterium of interest using bacteriophages directed against selected bacterium. **Primary outcome parameters** are body weight, glucose tolerance and insulin sensitivity (as assessed by procedures 1a-d described below).

Secondary outcome parameters Tissues will be analyzed after termination of the experiment (*e.g.*, bacterial DNA content in tissues, expression of proteins and genes involved in glucose and energy metabolism).

Following Go-No Go decision making (*i.e.*, if one of the primary outcome parameters is affected, see 3.4.3 Project proposal), we will carry out dedicated studies to further unravel the mechanism by which the intervention influences metabolic processes that are typically deranged in obesity and T2DM (procedures 3 – 5). Additionally, dedicated experiment assessing intestinal permeability will be carried out (procedure 2)

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.

Procedures and justifications (J):

Supplementation or removal of bacteria.

Bacteria or bacterial metabolites will be supplemented or removed (using bacteriophages) by gavage (orogastric administration). This will require careful restraining of the mice. **(J)** Precise dosing is crucial and bacteria/bacteriophages are very sensitive to environmental exposure (e.g., cannot be exposed to oxygen) and have to be administered locally.

1 Measurements of primary outcome parameters:

a) body weight

Mice will be weighed throughout the experimental period. **(J)** It is of critical importance to closely monitor body weight in all experiments. This indicates overall health of the mice and is a crucial determinant for development of obesity.

b) Glucose tolerance testing (GTT) and Insulin tolerance testing (ITT)

Mice will be fasted prior to these tests. Blood glucose will be measured from the tip of the tail using a glucometer prior to an intraperitoneal (ip) injection or oral bolus of glucose. Subsequently, blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after glucose administration. **(J)** This test gives a rapid and validated estimation of whole body glucose responsiveness. After recovery the same mice can be used for an ITT; Blood glucose will be measured from the tip of the tail prior to an ip injection of insulin. Blood glucose levels will be measured from the tip of the tail using a glucometer at several time intervals after insulin administration. **(J)** This test provides a validated estimation of whole body insulin responsiveness without requirement of invasive surgical procedures.

c) Tissue collection

After **a-c** have been performed, mice will be anesthetized. Tissues and organs will be removed and snap frozen in liquid nitrogen or processed according to requirements of further analysis. *Ex vivo* analysis of tissues (e.g., lipid analysis, bacterial rDNA analysis, histology, cytokine profiling, FACS analysis, protein and gene expression analysis), will **(J)** provide mechanistic insight in regulatory pathways that coordinate *in vivo* observations.

Cumulative discomfort: "licht"

Power analysis performed by us in previous mouse studies usually suggests using around 10 mice per group to obtain relevant differences in insulin sensitivity and glucose tolerance.

Group size: (based on unpublished data) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 20%, standard deviation: 16% -> 10 animals per group.

2) Intestinal permeability

FITC-dextran, D-Xylose or fluorescently labeled bacteria are examples of compounds that allow for analysis of passage of molecules (either in between intestinal cells or through intestinal cells, respectively). Mice will be fasted prior to receiving an oral bolus of such a compound. Blood will subsequently be collected at several time intervals after administration. During termination of the

mice a large blood sample will be collected in which, apart from permeability markers, also blood lipids can be measured. **(J)** Translocation of FITC-dextran or D-Xylose from the intestine into the blood stream is a measure of intestinal permeability and reflects gut barrier function.

Mice will be anesthetized and the common mesenteric lymph duct will be exposed by removal of surrounding tissues. A small catheter will be inserted into the lymph duct through a small incision and fixed to the lymph duct using tissue glue. Mice will remain anesthetized throughout the experiment and will receive an analgesic. Lymph will be collected at several time intervals after start of the experiment. After collection of the last sample, mice will be terminated. **(J)** Collected lymph will be analyzed for lipid content, presence of bacteria and immune cells. We hypothesize that translocated bacteria or bacterial products enter the system via the lymphatic system. This procedure will provide crucial insight in the route of bacterial entrance into the system.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

3 Energy homeostasis

Metabolic cages

Whole body energy metabolism will be assessed using an open circuitry calorimetric system (PhenoMaster system) or comparable device. Mice will be single housed in and habituated to the cages prior to the start of the analysis. Individual food intake will be assessed. **(J)** Alterations in microbiome composition have been associated with changes in energy homeostasis. Metabolic cages allow for sensitive analysis of energy homeostasis in a minimally invasive manner.

Cumulative discomfort: "matig"

Group size: Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 20% -> 10 animals per group

4 Glucose/insulin homeostasis

4a) Whole body glucose tolerance test

Mice will be fasted prior to the test. Mice are injected intraperitoneally with a low dose of stable isotope-labeled glucose. Before and every 30 minutes for 6 hours, blood glucose concentrations are measured in blood through tail-tip bleeding. At the same time points, blood spots are taken on filter paper. After the test a blood sample will be taken from the tail vein. **(J)** This test monitors glucose homeostasis under basal conditions and has the advantage that mice are not terminated after the test but can be reused for other tests. (Please note that this test differs from the test described in **1b**)

4b) Hyperinsulinemic euglycemic clamp

Mice will be equipped with a jugular vein cannula that allows for non-invasive administration of solutions in awake mice. In short, mice will be anesthetized and a cannula will be inserted and fixed into the jugular vein. The free end of the cannula will subsequently be tunneled to a small incision in the neck. The cannula will be attached to the skull using acrylic glue. Mice will be administered an analgesic and allowed to recover for 3-6 days prior to infusion experiments. After placement of the jugular vein cannula, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the cannula or stitches.

Mice will be fasted prior to the test. Mice will be infused with solutions containing insulin and/or

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: [redacted] Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

5d Bile salt flux

Mice will be intravenously administered with a stable (non-radioactive) isotope-labeled bile salt. Blood will be collected at several time points after administration. At the end of the experiment, mice will be submitted to bile duct ligation to collect bile and subsequently terminated. **(J)** Bile salt composition is in great part determined by the gut microbiota. In addition to *ex vivo* determination of bile salt composition in several compartments (*e.g.*, feces, plasma), flux analysis of bile salts (*e.g.*, of cholate) *in vivo* will demonstrate if altered microbiome composition affects bile salt turnover.

Cumulative discomfort: "licht"

Group size: (Boesjes et al 2014 PloS One) Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, effect size: 25%, standard deviation: 23% -> 13 animals per group

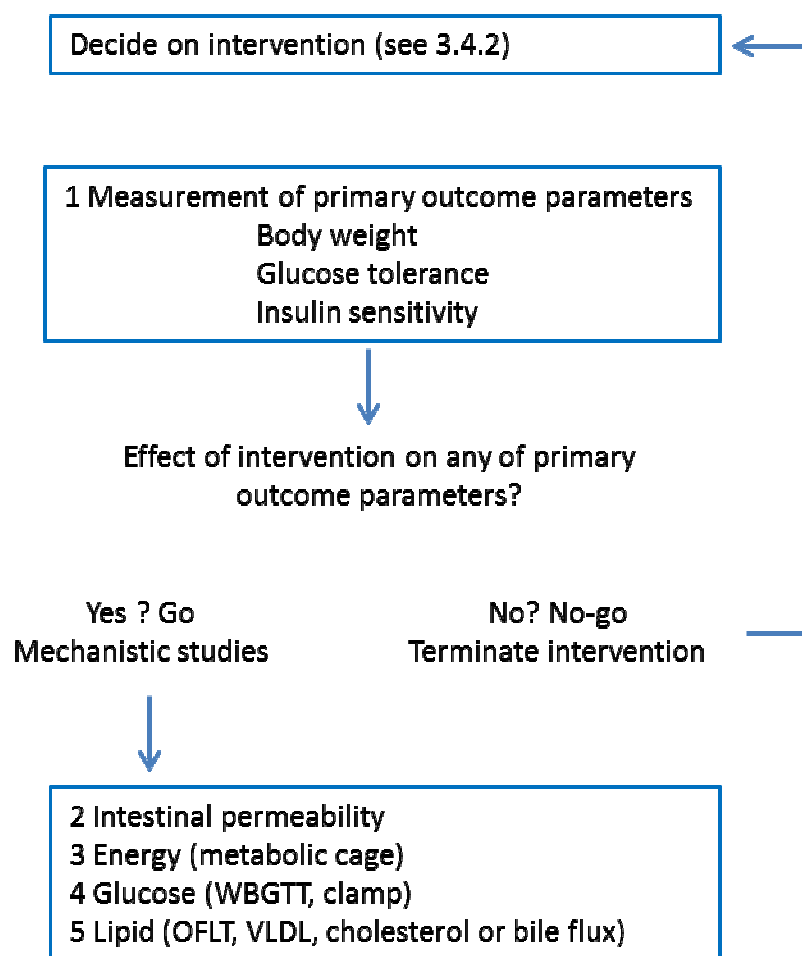


Figure 1. Summary of Go and No-go approach (see project proposal 3.4.3). Numbers in flow

scheme correspond with the animal experiments as indicated in the Appendix

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

Statistical groupsize calculation is used to minimize the total number of animals required (Van Lenth the American statistician 2001 Some practical guidelines for effective sample size determination). The extensive experience of our laboratory will be used in minimizing the required number of animals per group as much as possible. Animals will be followed up longitudinally and used to analyze multiple aspects of glucose, lipid and bile acid metabolism. Experiments are designed to extract the maximum amount of information out of each animal without causing unnecessary discomfort and discomfort beyond 'matig'. The number of animals required for these experiments are based on sample-size calculations using historical published and unpublished data from our laboratory, from our collaborators and from literature.

B. De dieren

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

Species: mouse

Origin: commercial providers, collaborating research groups

Age: adult mice (range ~4 and 20 weeks)

Gender: The experiments described in this proposal will only make use of male animals.

Reasons:

1) The objective and sub-goals do not include any aspect on gender. It is not within the scope of this proposed research to include the element of gender because it does not contribute to answering any of the sub-goals nor the objective. 2) Our main objective is to study the role of gut bacteria in development of obesity and type 2 diabetes. In order to do so, one of the requirements is to have a validated model (=male mice) that develop the pathology in standardized condition (eg, high-fat diet). Only under these conditions, it will be possible to study the additional role of bacteria. (Since female mice generally respond differently to HFD feeding compared to males (eg, female mice seem to be fairly protected from adipose tissue inflammation, glucose intolerance, hyperinsulinemia and islet hypertrophy), female animals are a less suitable model system. Use of female mice would require validation, optimization and standardization of all procedures. It is not within the scope of this proposed research (nor do we have the financial means or time to do so) to include the optimization and standardization of new animal models, new diets, new disease phenotypes, new measurement techniques and new surgeries.

Estimated numbers:

Since we cannot predict if bacteria/bacteriophages will be successful (as determined using methods described under Beoogde handelingen 1a-d), we will here assume that all interventions will be successful and therefore that all suggested experimental procedures will be carried out (all go).

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 1 will be 210, discomfort "licht":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) (10*3=30); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 (30*7=210)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 2 will be 273, discomfort "matig".

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 3 will be 231, discomfort "matig":

10 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($10*3=30$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($30*7=210$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 4 will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5a+b will be 231, discomfort "matig":

11 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($11*3=33$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($33*7=231$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5c will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

The estimated maximal number and associated discomfort for individual animals for procedure 5d will be 273, discomfort "licht":

13 mice per group * 3 groups (control, heat-inactivated control, active bacteria) ($13*3=39$); estimated number of bacteria/bacterial metabolites or bacteriophages assessed in five year license is 7 ($39*7=273$)

Estimated number of mice: 1701 mice (not corrected for HEP)

Maximum discomfort: "matig" (Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

945 mice (=55%) have discomfort 'matig'. A maximum of 10% of mice in this category might reach a HEP. We therefore calculate an additional 10% of mice for this category (=95 mice). The discomfort matig will therefore be 58%.

The total number of mice is $1701 + 95 = 1796$

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Reduce:

Several of the suggested procedures (*e.g.*, OGTT/ITT/OFLT) can be carried out within one animal experiment thereby reducing animal numbers. Other experiments, however, require dedicated groups of mice because the procedure results in termination of the animal (*e.g.*, euglycemic clamps, VLDL secretion, lipid fluxes). This unfortunately prevents the possibility to reuse the animal for additional experimental procedures. To maximize usage of materials (*e.g.*, blood or tissues) collected, these will be available to collaborating research groups.

Using 'Go' and 'No-go' criteria (see section A), we will proceed (or not) with in-depth follow-up experiments and decide which experiments are required and which ones can be skipped. This allows for development of dedicated experiments thereby reducing the number of mice required to answer the scientific questions.

All procedures will be carried out by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce failure of experimental procedures (and thereby loss of animals).

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Refine:

Mice will be acclimated prior to the experiments. Except for metabolic cage experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (*e.g.*, repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (*i.e.*, administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the

animals.

Replace:

Methods aiming to reduce or replace suggested experiments include *in vitro* (in organoids or cell models) assessment of efficacy, safety and effect of bacteria and compounds of interest. Although these studies will be carried out prior to the animal experiments, they cannot yet fully replace studies that require multicellular, complex systems.

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.

We do not propose experiments that require materials that are damaging to the environment. We will make sure to order bacteria and compounds in amounts sufficient for the suggested experiments thereby reducing waste. Any leftover materials will be disposed of according to health and safety guidelines.

To reduce stress during the intervention, we would like to refer to our reduction points:

Since restraining (for gavage) can be stressful to unaccustomed animals, we will perform daily placebo gavages prior to starting the experiments in order to habituate the mice, thereby reducing the amount of stress during the experiment. While this might rather amplify the cumulative amount of stress for the mice, the results will diverge less, which will contribute to a reduction of the number of animals needed.

Except for metabolic cage and hyperinsulinemic euglycemic clamp experiments, mice will be housed in groups. We will work with male mice that sometimes fight. This will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting.

Surgical procedures and/or repetitive procedures that might cause pain or serious discomfort (e.g., repetitive blood sampling) to the animal will be performed under appropriate soothing conditions (i.e., administration of anesthetic and/or analgesic).

All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals. Inexperienced participants to the studies will receive training in dedicated animals (oefenprotocol) prior to joining the experiments.

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.

We have performed literature studies and are in close contact with research groups that work in the same field and have related research questions. We have no indications that the suggested experiments have been previously performed.

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.

Studies assessing energy metabolism require individual housing of the mice in metabolic cages that might contain a roster for a max of 5 days.

After placement of jugular vein catheter, mice will be housed individually to prevent cage mates from chewing on the stitches or catheter connection point.

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.

Anesthesia will be administered prior to surgical procedures and termination of the mice. Means: inhalation (e.g., isoflurane) or injection (e.g., Hypnorm and Diazepam,)

Analgesia will be administered after survival surgery and during surgery under anesthesia (e.g., lymph and bile cannulation). Means: injection: (e.g., Buprenorphine)

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We do not predict additional health deteriorations

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

Criteria: weight loss (>10%/week), isolation, decreased locomotion, wounds, hunched back or diarrhea

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

<10% overall

K. Classificatie van ongerief

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

The highest inconvenience score of suggested experiments in this Appendix 1 is "matig", therefore the overall discomfort score will be 'matig'.

(Discomfort "matig" in 58% of animals; "licht" in 42% animals)

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.

Tissues/organs will be collected for subsequent analysis in the laboratory.

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

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity**
3. Titel van de NTS **De rol van darmbacteriën bij diabetes en overgewicht**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken **10-11-2016**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
8. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager **n.v.t.**
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord

- Verstrek(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) [n.v.t.](#)

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

[>Ja](#)

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft

[> een nieuwe aanvraag.](#)

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

[> Ja](#)

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

[> Nee](#)

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).

[Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling \(het verkrijgen van inzicht in de rol van darmbacteriën \(microbiota\) in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes\) en kan getypeerd worden als een project met twee subdoelen, die tijds- en uitkomstafhankelijk zijn. De twee subdoelen zijn gericht op:](#)

- [i\) microbiota gemedieerde ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes;](#)
- [ii\) microbiota gemedieerde effecten op bacteriële translocatie en darmbarrièrefunctie.](#)

[Het eerste subdoel wordt behaald door mechanistische studies in muizen waarin onderzocht wordt hoe bacteriën en bacteriële metabolieten bijdragen aan het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes.](#)

[Voor het tweede subdoel wordt onderzocht hoe bacteriën en bacteriële metabolieten die zich kunnen verplaatsen van het darmlumen naar de periferie, en hoe deze translocatie de immuunsignaleringsroutes kan beïnvloeden en vervolgens de ontwikkeling van deze aandoeningen versterkt of juist remt. Het eerste subdoel levert informatie over het effect van de bacterie \(of zijn metabolieten\) op het ontwikkelen van deze aandoeningen, waarna in het tweede subdoel het onderliggende mechanisme door middel van translocatie verder wordt onderzocht. De subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project is haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.](#)

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.
Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
 - > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
 - > De aangekruiste doelcategorieën "fundamenteel" en "translationeel onderzoek" sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan hoe darmbacteriën de immuunrespons kunnen beïnvloeden door de translocatie van het darmlumen naar de periferie. Het translationele gedeelte van deze studie gebruikt ziektemodellen om dit effect van bacteriën op de ziekte te bestuderen. Er zullen interventies worden toegepast door de bacterie-stam te verwijderen of juist toe te dienen. Deze kennis kan bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe behandelmethodes voor obesitas en type 2 diabetes.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage 1 voor voorbeeld*).
 - > Het directe doel van het project is het krijgen van inzicht in de rol van darmmicrobiota in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes (translationeel onderzoek). Er wordt fundamenteel onderzoek uitgevoerd naar het onderliggende mechanisme waarbij de focus ligt op de capaciteit van de bacteriën om van het darmlumen naar de periferie te migreren en zo immunologische processen te beïnvloeden.
Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van nieuwe startpunten voor het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor obesitas en type 2 diabetes.
Het betreft hier zowel fundamenteel als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage 1 voor voorbeeld*).
 - > De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol van darmbacteriën in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de mensen met obesitas en patiënten met type 2 diabetes.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren die gebruikt worden zullen licht (45%) tot matig (55%) ongerief hebben. De verschillende methodes en behandelingen worden uitgebreid besproken in de bijlage "Beschrijving dierproeven" met het bijbehorende cumulatief ongerief per methode.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: de onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor de mensen met obesitas en diabetes type 2 patiënten bevorderd worden: het ontwikkelen van een nieuwe behandelmethodede om deze ziektes te bestrijden.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

Dit project is een voortzetting van een bestaande onderzoekslijn van deze onderzoeksgroep [REDACTED]. Binnen de onderzoeksgroep, de afdeling en hun samenwerkingsverbanden is er voldoende expertise in huis om alle voorgestelde proeven uit te kunnen voeren en is er voldoende kunde in huis om aan de 3V beginselen te kunnen voldoen.

Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van de experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen. De DEC verwacht dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

8. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1*; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden).

- 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: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

9. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

10. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief. De DEC is van mening dat het ongerief realistisch is ingeschat en geclassificeerd.

11. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt nergens in die mate aangetast dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen, ernstige pijn of langdurig ongerief.

12. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Het humane eindpunt is helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken (>10% gewichtsverlies/week, afzonderen, verminderde activiteit, wondjes, bolle rug of diarree) lijkt op basis van de ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat (<10% van de dieren).

13. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aanvrager geeft aan dat in vitro methodes gebruikt worden waar het kan maar dat deze niet het complete multicellulaire, complexe systeem kunnen nabootsen dat betrokken is bij het ontwikkelen van deze aandoeningen. Daarom zijn in vivo proeven onvermijdelijk.

14. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De groep heeft veel ervaring met de assays en de ziektemodellen waardoor ze een realistische inschatting kunnen maken van (klinisch/biologisch) relevante verschillen en de te verwachten variatie. Met behulp van deze informatie is voor elk van de experimenten een minimale groeps grootte berekend, uitgaande van 80% power en een tweezijdig significantieniveau van 0.05.

15. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Interventies met bacteriën of bacteriële metaboliëten worden gebaseerd op gegevens verkregen uit analyses van darm- en vetweefsel van gezonde mensen ten opzichte van mensen met obesitas/type 2 diabetes. Hierdoor wordt getracht bacteriestammen te selecteren die een hoge potentie lijken te hebben om daadwerkelijk een effect te hebben. Daarna wordt een interventie gestart waar bekeken wordt of de interventie een significant effect heeft op één van de vastgestelde criteria die samenhangen met de ontwikkeling van obesitas en/of type 2 diabetes. Daarna zal pas verder gegaan worden met de verdere analyse van het geïnduceerde fenotype van de ziekte op verschillende manieren. Het inbouwen van verschillende Go/No Go beslissingen borgt de verfijning omdat alleen de vervolg analyses matig ongerief kunnen veroorzaken in de dieren. Er wordt zo voorkomen dat dieren onnodig aan deze analyses onderworpen worden. Het humane eindpunt voor het ziektemodel is duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

16. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

> In dit onderzoek wordt enkel gebruik gemaakt van mannelijke muizen. De onderzoekers geven de volgende wetenschappelijke reden, waardoor de DEC deze keuze voldoende onderbouwd vindt:

Vrouwelijke muizen reageren anders op een hoog vet dieet en zijn meer beschermd tegen het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes. Hierdoor zijn vrouwelijke muizen minder geschikt als modeldier. Het model is volledig gevalideerd in mannelijke muizen en dus niet in vrouwelijke dieren vanwege de verwachte ongeschiktheid.

18. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is.

> n.v.t.

NTS

19. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol die darmbacteriën of hun metaboliëten spelen in het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes, het geringe (45%) tot matige (55%) ongerief dat de 1796 muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol die darmbacteriën of hun metaboliëten spelen in het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes in een muizenmodel, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op de wat langere termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan obesitas en/of type 2 diabetes.

De maximaal 1796 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het stress en pijn (vasten, verblijven in een metabole kooi, plaatsing canule bovenop de kop) veroorzaakt. De dieren zullen licht (45%) tot matig (55%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen kennis en inzichten krijgen over de rol van bacteriën en/of bacteriële metaboliëten in de ontwikkeling van obesitas en type 2 diabetes. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

De waarden en belangen van patiënten spelen een belangrijke rol in het translationele deel van dit onderzoek. De bruikbaarheid van dit idee kan een belangrijke bijdrage leveren aan het daadwerkelijk ontwikkelen van deze therapie.

Het geringe tot matige ongerief dat de dieren zullen ondergaan, acht de DEC gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC waardeert het aantonen van de interventie op de microbiota van de darm als behandeling voor obesitas en type 2 diabetes alsmede het wetenschappelijke belang van het fundamentele gedeelte (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de eerder waargenomen associatie van de samenstelling van de darmmicrobiota met deze aandoeningen), als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het ongerief van de 1796 muizen staat.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage 1 voor voorbeeld*).

De rol van darmbacteriën bij diabetes en overgewicht

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van inzicht in de rol die darmbacteriën en hun metaboliëten kunnen spelen in het ontwikkelen van obesitas en type 2 diabetes en daarbij het inzicht wat een interventie met specifiek bacteriestammen en hun metaboliëten voor effect kan hebben in een muizenmodel voor obesitas en/of type 2 diabetes, het lichte (45%) tot matige (55%) ongerief dat de in totaal 1796 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Dit project heeft zowel een fundamenteel als translationeel karakter. Eerst zal bepaald worden of een interventie met een bacteriestam effect heeft op parameters die betrokken zijn bij het ontwikkelen van deze aandoeningen. Daarna zal het effect nader bestudeerd worden en daarnaast zal er ook fundamenteel onderzoek gedaan worden naar hoe bacteriën of hun metaboliëten de darmwand passeren en in de periferie terechtkomen en hoe deze translocatie de immuunrespons binnen deze ziektes kan beïnvloeden.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van deze doelstellingen binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum beperkt blijft. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren 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
 - Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen

 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren: ...

 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag: ...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het advies is in de DEC vergadering unaniem tot stand gekomen.

3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Dit projectvoorstel heeft geen knelpunten of dilemma's opgeleverd bij het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

[REDACTED]

Meibergdreef 31

1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016794

Bijlagen

2

Datum 20 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 december 2016. Het gaat om uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002016794. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

20 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD118002016794

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68TABO0136166741
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: AMC Crediteurenadministratie

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2017
Geplande einddatum: 1 januari 2022
Titel project: Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity
Titel niet-technische samenvatting: De rol van darmbacteriën in de ontwikkeling van diabetes en overgewicht
Naam DEC: Dierexperimentencommissie AMC
Postadres DEC: Meibergdreef 31, 1105AZ Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 935,-
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: Voorzitter IvD
Plaats: Amsterdam
Datum: 16 december 2016

Datum:
20 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD118002016794



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Meibergdreef 9
1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016794
Bijlagen
2

Datum 20 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 december 2016
Vervaldatum: 19 januari 2017
Factuurnummer: 16700794
Ordernummer: 7195

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002016794	€ 935,00

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016794

Datum 4 januari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" met aanvraagnummer AVD118002016794. 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

In de Bijlage Dierproeven geeft u aan dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd volgens Bijlage III van de richtlijn (vraag F). Er zijn echter dieren die individueel gehuisvest worden, wat niet volgens Bijlage III is. Bijvoorbeeld bij het huisvesten in metabole kooien. Kunt u aangeven of er hier sprake is van een metabole kooi waarbij de dieren op een roosterbodem gehuisvest zijn en in dat geval, hoe lang de dieren hierin gehuisvest zijn. De afwijkende huisvesting geldt ook voor de dieren die na de vena jugularis canulatie individueel gehuisvest zijn. Kunt u dit in een nieuwe Bijlage Dierproeven aanpassen?

Verder geeft u aan dat 55% van de dieren matig en 45% licht ongerief zullen ondervinden. Uitgaande van 1701 dieren klopt dit inderdaad. U wilt echter 95 dieren toevoegen, wat een totaal van 1796 dieren oplevert. Kunt u het percentage van het ongerief aanpassen?

Het ongerief benoemt u ook in de NTS. Wilt u daarnaast de zin in 3.6 ook aanpassen: "De dieren worden na afloop van de proeven gedood afgemaakt."? In de NTS beschrijft u onder punt 4.3 dat de dieren in groepen worden gehuisvest, wat niet voor alle dieren geldt. Wilt u een nieuwe NTS sturen waarin u de genoemde punten heeft aangepast?

Datum:
4 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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. 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 Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Academisch Medisch Centrum

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD118002016794

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:

4 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002016794

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



**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
AVD118002016794
Bijlagen
1

Datum 6 februari 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" met aanvraagnummer AVD118002016794. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 10 januari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de afwijkende huisvesting van de dieren, het te verwachten ongerief en een nieuwe NTS. Bijlage 3.4.4.1 en de Niet Technische Samenvatting zijn 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 "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" starten. De vergunning wordt afgegeven van 7 februari 2017 tot en met 1 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 10 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:
6 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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. Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

ir. G. de Peuter
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: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 7 februari 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Role of intestinal bacteria in development of diabetes in obesity" met aanvraagnummer AVD118002016794, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 december 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 10 november 2016, ontvangen op 16 december 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 10 januari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Effect of bacterial intervention on development of obesity and T2DM and bacterial translocation				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.796	58% Matig 42% 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

Aanvraagnummer:
AVD118002016794

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:
AVD118002016794

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:
AVD118002016794

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.