

Inventaris Wob-verzoek W17-17		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 20171185	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	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven				x	x	x	x	
5	DEC-advies				x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x		
7	Adviesnota CCD		x						x
8	Beschikking en vergunning				x		x		



22 AUG. 2017

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.	<table border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">Acedemisch Medisch Centrum</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>343362777</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Meibergdreef</td> <td>31</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>1105AZ</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL68TABO0136166741</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">AMC Crediteurenadministratie</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Acedemisch Medisch Centrum		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	343362777		Straat en huisnummer	Meibergdreef	31	Postbus			Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam	IBAN	NL68TABO0136166741		Tenaamstelling van het rekeningnummer	AMC Crediteurenadministratie	
Naam instelling of organisatie	Acedemisch Medisch Centrum																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																									
KvK-nummer	343362777																									
Straat en huisnummer	Meibergdreef	31																								
Postbus																										
Postcode en plaats	1105AZ	Amsterdam																								
IBAN	NL68TABO0136166741																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	AMC Crediteurenadministratie																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	[REDACTED]	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	[REDACTED]																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	[REDACTED]																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Postdoc</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED] Academisch Medisch Centrum,</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	[REDACTED]	Functie	Postdoc		Afdeling	[REDACTED] Academisch Medisch Centrum,	Amsterdam	Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	[REDACTED]																								
Functie	Postdoc																									
Afdeling	[REDACTED] Academisch Medisch Centrum,	Amsterdam																								
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>Postdoc</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED] Academisch Medisch Centrum,</td> <td>Amsterdam</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	[REDACTED]	Functie	Postdoc		Afdeling	[REDACTED] Academisch Medisch Centrum,	Amsterdam	Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	[REDACTED]																								
Functie	Postdoc																									
Afdeling	[REDACTED] Academisch Medisch Centrum,	Amsterdam																								
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]
Functie	PhD candidate
Afdeling	[REDACTED], Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
Telefoonnummer	[REDACTED]
E-mailadres	[REDACTED]

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag

Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum	1 - 10 - 2017
Einddatum	1 - 10 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Murine pancreatic islet isolation

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie

- 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	[REDACTED]



Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries
- Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.

Effect of bacterial translocation on the endocrine function of the pancreatic islets

Type 2 diabetes (T2D) has risen to epidemic proportions resulting in major morbidity and mortality. Approximately one in eleven adults has diabetes nowadays, making it to one of the largest global health emergencies of the 21st century [1]. In addition to insulin resistance, impaired function and destruction

of the insulin-producing beta cells form a direct cause for hyperglycaemia and T2D [2]. Therapies that may halt or reverse this detrimental process are warranted. An inflammatory process in pancreatic islets, with infiltration of immune cells, is present in T2D; however, the primary trigger for this inflammatory response remains unknown. This inflammatory process and a subsequent loss of function of these cells has important consequences for the development of T2D since this cell cluster (islets of *Langerhans* or pancreatic islets) include the insulin producing beta cells (approx. 80% of the islet cells) [3].

Recently, (diet-induced) alterations in intestinal microbiota composition were shown to associate with T2D; notably more potentially pathogenic bacteria/microorganism are increased in T2D (unpublished data). In addition, T2D patients show increased translocation of detrimental bacteria from the intestinal lumen into surrounding tissues ('leaky gut'), previously shown to induce adipose tissue inflammation and dysfunction [4]. Here, we hypothesize that increased bacterial translocation or translocation of bacterial components (metabolites or LPS) to the pancreas induces inflammation and beta cell dysfunction in T2D.

We will investigate this hypothesis first by identifying micro-organismal DNA in pancreatic tissue harvested during pancreatectomy in patients with and without T2D. The identified microorganisms with highest pathogenicity will be (an)aerobically cultured and subsequently used in *in vitro* incubation experiments using freshly isolated murine pancreatic islets. Islet physiology will be assessed *via* beta-cell function (e.g. insulin expression and release) and inflammatory gene and protein marker expression. We expect that this study will render a novel and unique approach to relate the effect of translocation of intestinal bacteria or bacterial components (e.g. metabolites or LPS) to islet inflammation and beta-cell dysfunction in T2D.

Preliminary studies suggest that incubation of freshly isolated murine pancreatic islets reduce insulin secretion during glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (Figure 1). Importantly, no changes in insulin secretion were observed in a pure beta-cell line (INS1E, data not shown). Since this pure cell line does not harbour any immune cells, we expect that immune cells mediate the effects observed in freshly isolated pancreatic islets [5]. To assess our research question, this project therefore depends on the routine isolation of freshly isolated murine pancreatic islets. In the scope of this proposal, we will investigate the direct effect of bacteria or bacterial components (e.g. metabolites or LPS) on pancreatic islet function, with a focus on insulin-producing beta cells. Insulin-related marker expression and inflammatory marker expression will help us understand how bacteria or bacterial components (e.g. metabolites or LPS) influence beta cell function and diabetes development.

The importance of identified markers will be verified in islet isolated from diet-induced obese (insulin resistant) mice and in different knock-out mouse models. By using these models we hope to find genes or proteins that could be targeted for novel treatment strategies. Further, we will use islets from diet-induced obesity (DIO) mice to find potential differences between obese and lean mice since T2D is highly associated with high body weight and we expect that islets from DIO mice respond differently to bacterial treatment [1]. Last, we aim to identify different bacterial components, which are able to induce an inflammatory response and reduce insulin secretion. Lipopolysaccharide (LPS) is an example of a bacterial component that induces an inflammatory response. LPS is increased in the circulation of diabetic and obese subjects compared to healthy lean subjects [6]. Using proteomics approaches, we aim to identify bacterial components or metabolites that are able to induce an inflammatory response and reduce insulin secretion from beta cells. Results obtained from the proposed studies will help us to develop new treatment strategies to target harmful bacteria or bacterial components and prevent or restore loss of beta cell function.

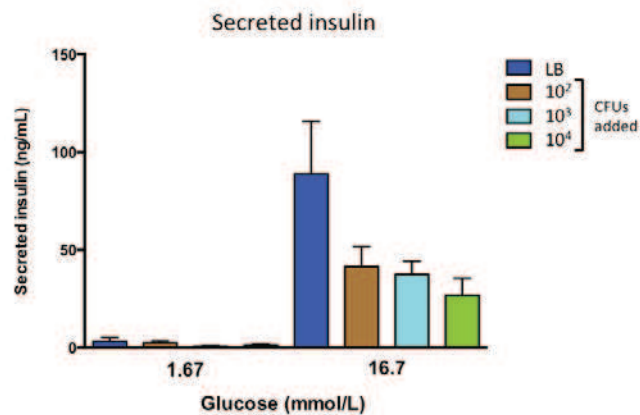


Figure 1: Incubation of freshly isolated murine pancreatic islets [REDACTED] reduces insulin secretion in vitro (Abbr. Colony forming units, CFUs).

References

- [1] International Diabetes Federation, "IDF Diabetes Atlas," Seventh edition, 2015.
- [2] S. E. Kahn, M. E. Cooper, and S. Del Prato, "Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future," *Lancet*, vol. 383, no. 9922, pp. 1068–1083, Mar. 2014.
- [3] M. Y. Donath, "Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 6, pp. 465–476, Jun. 2014.
- [4] J. Amar *et al.*, "Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment," *EMBO Mol. Med.*, vol. 3, no. 9, pp. 559–572, Sep. 2011.
- [5] B. Calderon *et al.*, "The pancreas anatomy conditions the origin and properties of resident macrophages," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 212, no. 10, pp. 1497–1512, Sep. 2015.
- [6] M. Trøseid, T. K. Nestvold, K. Rudi, H. Thoresen, E. W. Nielsen, and K. T. Lappegård, "Plasma Lipopolysaccharide Is Closely Associated With Glycemic Control and Abdominal Obesity," *Diabetes Care*, vol. 36, no. 11, pp. 3627–3632, Nov. 2013.

3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

The overall aim of this project proposal is to obtain mechanistic insight in the role of the gut microbiota in development of T2D. We will specifically focus on the **effect of (translocating) bacteria or bacterial components on pancreatic islet cells**.

What is the effect of (translocating) bacteria on the pancreatic beta cell function (insulin secretion)?
 What is the effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islet cells?

Main objective: To gain mechanistic understanding of the effect the gut microbiota on development of T2D, with particular focus on bacteria-mediated effects on endocrine function of pancreatic islets.

Sub goal 1: The effect of (translocating) bacteria on the insulin activity (release and expression) of pancreatic islets.

Sub goal 2: The effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islets.

Sub goal 3: The effect of (translocating) bacteria on immune cells of pancreatic islets.

Sub goal 4: The effect of (translocating) bacteria on the protein-cell interaction in pancreatic islets.

and treat metabolic diseases such as obesity and type 2 diabetes. Our results will help to generate new treatment strategies.

3.4 Research strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

The overall project strategy will be top-down. [REDACTED]

[REDACTED] In this study, we will isolate and sequence bacterial DNA from human pancreatic biopsies of T2D subjects. Strains or groups of bacteria that correlate with T2D will be selected for *ex vivo* treatment of freshly isolated pancreatic islets.

We will isolate murine pancreatic islets and incubate this cell complex with (heat-inactivated) bacteria. A glucose stimulated insulin secretion (GSIS) test will tell us if there are differences in the insulin secretion and expression in the treatment group vs control (sub goal 1). An alternative bacterium (not present in human pancreatic biopsies) will be used to confirm the uniqueness of the effect of the bacterium of interest in inducing beta-cell function loss (according to Koch`s postulates; for animal number calculations, see appendix).

Main objective: To gain mechanistic understanding of the effect the gut microbiota on development of T2D, with particular focus on bacteria-mediated effects on endocrine function of pancreatic islets.

Following Go/No-Go decision-making, we will carry out dedicated studies to unravel the mechanism by which the intervention (bacterial treatment) influences metabolic processes of pancreatic islets that are typically deranged in obesity and T2D. We aim to achieve around 20% reduction of insulin secretion after bacterial treatment compared to controls (=Go), which is comparable to the development of T2D in human [1]. If insulin expression and secretion are not affected during bacterial treatment (=No-Go), no further animals will be used (see Figure 2). According to Koch`s postulate, we will choose a bacterial strain that has been identified in human pancreatic biopsies (diabetic vs non-diabetic) and incubate this strain with freshly isolated pancreatic islets (sub goal 1). If we see differences between the treatment and control groups, we will focus on this strain and continue with sub goal 2-4 to assess the role of the immune system on the response of islets to bacteria. Next, we will verify our results (from sub goal 1-3) in different mouse models, including DIO mice and knock-out mice (sub goal 5 and 6). Last, using targeted proteomics, we aim to identify bacterial immunogenic components that can induce an inflammatory response and subsequently an insulin loss of pancreatic islets. These identified compounds can be used to for diagnostic purposes.

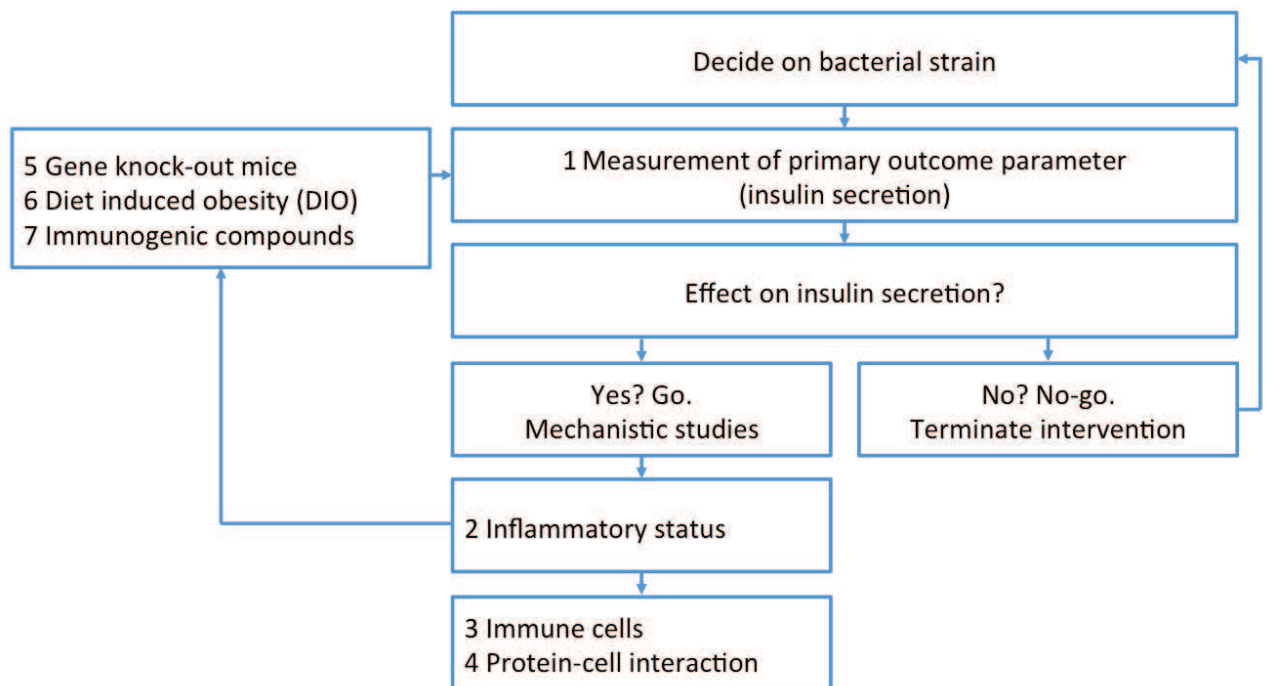


Figure 2: Scheme for Go/No-Go decision making of this proposal.

Sub goal 1: The effect of (translocating) bacteria on the insulin activity (release and expression) of pancreatic islets.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria and measurement of secreted as well as insulin content during GSIS.
- Go, if the insulin secretion is around 20% lower in treated samples compared to the controls. Continue with sub goal 2.
- No-Go, if the insulin secretion is not different from control samples. Choose another bacterial strain from the most abundant strains identified in human pancreatic biopsies or end the project.

Sub goal 2: The effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islets.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria and measurement of inflammatory marker expression (gene and protein level).
- Go, if the inflammatory marker expression is around 20% different in treated samples compared to controls (e.g. more pro-inflammatory markers and less anti-inflammatory markers). Continue with sub goal 3.
- No-Go, if the inflammatory marker expression is not different from control samples. Choose another inflammatory marker or end the project.

Sub goal 3: The effect of (translocating) bacteria on immune cells of pancreatic islets.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria, followed by immune cell isolation and analysis.
- Go, if the immune cell type exhibits around a 20% different activation/phenotype in treated samples compared to the control (e.g. more pro-inflammatory macrophages and less anti-inflammatory macrophages). Continue with sub goal 4.
- No-Go, if the immune cell type does not exhibit a different activation compared to control samples. Choose another immune cell type or end the project.

Sub goal 4: The effect of (translocating) bacteria on the protein-cell interaction in pancreatic islets.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 with (heat-inactivated) bacteria. Islets will be fixed and analysed *via* immunohistochemistry (e.g. location of immune cells identified in sub goal 3 in relation to insulin producing beta-cells or uptake of heat-inactivated bacteria by islet cells during *in vitro* inoculation). Further, we validate the role of different proteins that we found in sub goal 1 and 2. With these results we complete the mechanistic studies.

Sub goal 5: The role of genes identified in sub goal 1 and 2 in the response to (translocating) bacteria with the aid of gene knock-out mice models.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from different knock-out mice models with (heat-inactivated) bacteria.
- Go, if the insulin secretion is unchanged in treated samples compared to control samples (both knock-out) and different from wild-type treated samples. Continue with experimental setup in sub goal 2 to verify the inflammatory status found in wild-type islets.
- No-Go, if the insulin secretion is different between treated samples and controls (both knock-out) and the same as wild-type treated samples. Choose another knock-out mode according to the findings of sub goal 2 or end the project.

Sub goal 6: The effect of (translocating) bacteria on pancreatic islets in diet induced obesity (DIO) mice.

- Model: Incubation of freshly isolated pancreatic islets from DIO mice (C57BL/6 background) with (heat-inactivated) bacteria.
- Go, if the insulin secretion is at least 20% lower in DIO islets compared to lean controls. Continue with experimental setup in sub goal 2 to verify the phenotype from lean mice.
- No-Go, if the insulin secretion from DIO islets is not different from lean controls. Choose another bacterial strain from the most abundant strains identified in human pancreatic biopsies or end the project.

Sub goal 7: Identification of immunogenic compounds from (translocating) bacteria, which induce the inflammatory response and subsequently, the insulin secretion loss.

- Model: Immunogenic compounds will be identified *via* targeted proteomics. Freshly isolated pancreatic islets from normal C57BL/6 mice will be incubated with an immunogenic compound (such as LPS) from our bacteria from of interested.
- Go, if the insulin secretion is at least 20% lower in treated samples compared to the control and the effect size is 2. Continue with experimental setup in sub goal 2.
- No-Go, if the insulin secretion is not different from control samples. Choose another immunogenic compound or end the project.

References

[1] C. Weyer, C. Bogardus, D. M. Mott, and R. E. Pratley, "The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus," *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 6, pp. 787–794, Sep. 1999.

3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

Sub goal 1: Insulin activity

Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with different concentrations of (heat-inactivated) bacteria. Different incubation times will show us an acute (1 hour) or chronic effect (72 hours) of bacterial treatment. Insulin will be measured in the media (secretion) and in lysed islet cells (content). RNA as well as proteins will be isolated and analysed for insulin related gene/protein expression (e.g. PDX1, MafA, INS1).

Sub goal 2: Inflammatory status

Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. RNA as well as proteins will be isolated from pancreatic islets and analysed for inflammatory markers (e.g. IL-1b, IL-6, TNF-a).

Sub goal 3: Immune cells

Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. The cell cluster of the pancreatic islets will be dispersed and immune cells will be isolated. Freshly isolated immune cells will be analysed for their inflammatory potential (FACS analysis).

Sub goal 4: Protein-cell interaction

Model: Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. Pancreatic islets will be fixed and stained for proteins/cell markers according to sub goal 1, 2 and 3.

Sub goal 5: Gene knock-out mice

Model: Gene knock-out mice models (e.g. IL-1b, IL-6, TLR4) will be purchased from commercial suppliers or obtained from collaborators. Freshly isolated pancreatic islets will be incubated with (heat-inactivated) bacteria according to concentration and incubation of sub goal 1. Insulin will be measured in the media (secretion) and in lysed islet cells (content). Results will be compared to wild-type mice.

Sub goal 6: Diet-induced obese (DIO) (insulin resistant) mice

Model: DIO mice will be purchased from commercial suppliers at an age of 10 to 12 weeks, DIO mice have been fed a special diet to induce obesity and insulin resistance. Incubation of freshly isolated pancreatic islets from DIO mice with (heat-inactivated) bacteria.

Sub goal 7: Immunogenic compounds of target bacteria

Model: Immunogenic compounds of the targeted bacterial strain will be identified *via* targeted proteomics. Freshly isolated pancreatic islets will be incubated an immunogenic compound (such as LPS) and insulin release and expression will be measured in the media as well as the cell lysate.

3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

The overall aim and specific focus points in this project are closely related: We could show already that bacterial translocation contributes to the development of obesity and T2D. Data on causality, however, are scarce. We hypothesize that presence of (translocating) bacteria contributes to the development of T2D (loss of insulin secretion). To test that, we will first incubate pancreatic islets with dominant bacterial strains, previously identified in human pancreatic biopsies (sub goal 1). If we find (significant) differences between treated and control samples, we will go on with sub goal 2 to investigate the mechanism in detail (gene and protein expression of inflammatory as well as insulin related markers). Next, we will relate these markers to specific cell types in the cell cluster of a pancreatic islet, which we will isolate and investigate their phenotype (sub goal 3). Previous experiments could show already that bacterial treatment does not affect the insulin activity of pure beta cell lines (INS1E). Therefore, we expect that the insulin loss in pancreatic beta cells is mediated through immune cells (see 3.1). To study the direct effect of different cells (especially immune cells) on insulin producing beta cells, we will perform immunohistochemistry to relate their locations to each other (sub goal 4). To highlight the importance of markers identified in sub goals 1-4, we will purchase knock-out mice models and perform the same tests as in sub goal 1 and 2 (effect of bacteria on pancreatic islets with specific gene knockout on insulin secretion and inflammatory status). We expect to reduce or even diminish the effect of bacteria on the insulin secretion while having an important gene knocked out. Understanding the mechanism behind the effect of bacteria on pancreatic islet function will help us to design new strategies for the treatment of gut microbiota mediated T2D development.

T2D is highly related to obesity. Here, we hypothesize that bacterial treatment *ex vivo* will have a stronger effect on islets from DIO mice than lean mice (sub goal 6). To confirm the mechanism found in

lean mice, we will perform sub goal 1 and 2 on diet induce obesity (DIO) mice. These findings will help us to understand the different mechanism in lean and obese subjects.

Lipopolysaccharide (LPS) is an important compound already used in various studies to show the immunogenic effect of Gram-negative bacteria on different cell types. Several studies showed that this compound is increased in obese and diabetic subjects compared to lean controls.

Here, we expect to find more bacteria-related substances that can induce an inflammatory response in pancreatic islets, which may lead to a function loss (loss of insulin expression and secretion). With the aid of a targeted proteomics approach (sub goal 7), we will identify potential targets of our bacteria of interest and incubate them with freshly isolated islets (sub goal 1 and 2). This will help us to develop new markers for the gut microbiota mediated T2D development and to find new prevention strategies.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	AMC	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Murine islet isolation

Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

Mice will be anesthetized and euthanized *via* cervical dislocation. Pancreatic islets will be isolated, cultured and incubated with different compounds (heat-inactivated bacteria or bacterial components such as LPS). Insulin secretion will be measured after glucose stimulated insulin secretion (GSIS; sub goal 1). Gene and protein expression will analysed after treatment (sub goal 2). Further, the cell cluster of the pancreatic islets will be dispersed and the immune cell activity (sub goal 3) as well as proximity to the insulin producing beta cells (sub goal 4) will be further investigated. Findings from these experiments will be validated in gene-knock out mice models (sub goal 5) and diet induced obesity (DIO) mice (sub goal 6). Further, we will identify in the next 5 years immunogenic compounds of the bacteria of interest with the aid of a targeted proteomics approach to assess their impact on the pancreatic islet function (sub goal 7).

Primary outcome parameter: Insulin secretion of pancreatic islets after bacterial treatment.

Secondary outcome parameters: Gene and protein expression (inflammatory markers and insulin related genes) as well as immune cell activity.

Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Procedure and Justification (J)

Anaesthesia prior to sacrifice for islet isolation (sub goal 1-7)

Mice will be anesthetized prior to the sacrifice (cervical dislocation) and pancreatic islet isolation.

Removal of the pancreas (sub goal 1-7)

The abdomen will be opened and a collagenase solution will be injection into the pancreas *via* the common bile duct. The extended organ will be excised and placed in a sterile tube for further applications. **(J)** Collagenase has to be injected to release pancreatic islet cells from exocrine tissue.

Diet induced obesity (DIO) (sub goal 6)

DIO mice will be purchased from authorized animal suppliers and islets will be isolated. **(J)** An obese phenotype is a prerequisite for T2D. We expect that pancreatic islet cells respond differently to bacterial presence.

Knock-out mice models (sub goal 5)

Different knockout mice will be purchased from authorized suppliers or from collaborators. Islet will be isolated. **(J)** To further investigate mechanistic findings (sub goal 1-4), we need to confirm these findings in gene knockout mouse models.

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

One mouse yields approximately 200-400 islets [12]. The response of islets to glucose depends on the size of islets. Only a subset of islets has comparable size (medium sized islets). Therefore, we use 200 islets per mouse for our calculations since not all islets can be used for the experiments (approx. 150 medium sized islets of 200 islets used for calculations). For a glucose stimulated insulin secretion (GSIS), 1 mouse is necessary for a condition in triplicates (e.g. treatment or control group; 50 islets per well = 150 islets total).

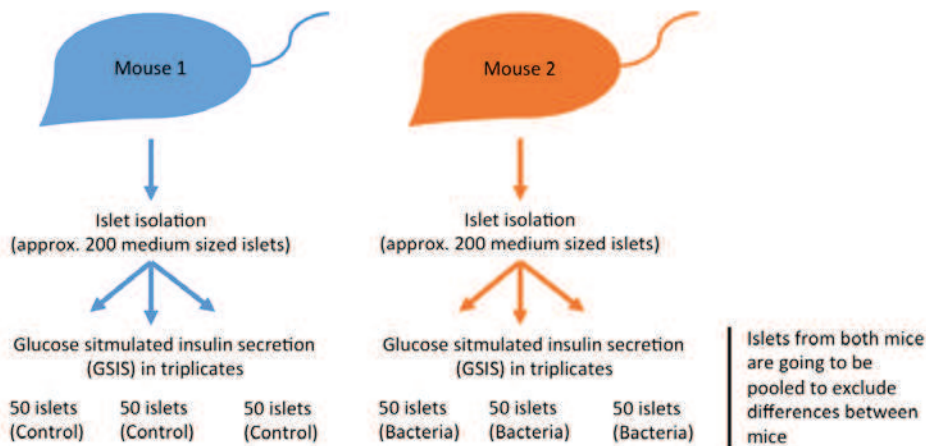


Figure 1: Scheme to clarify the experimental setup of a glucose stimulated insulin secretion (GSIS) and power calculation.

Sub goal 1: The effect of (translocating) bacteria on the insulin activity of pancreatic islets. We expect to test 10 different bacteria or bacterial components in the course of 5 years.

*5 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 100*

Power analysis performed suggests using 5 mice to achieve significance. Group size (based on unpublished data; insulin secretion of control islets vs. 10^2 CFU heat-inactivated bacteria treated islets): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 54.38, standard deviation: 26.9

(control) and 9.7 (treatment).

Sub goal 2: The effect of (translocating) bacteria on the inflammatory status of pancreatic islets.

*4 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 80*

Power analysis performed suggests using 4 mice to achieve significance. Group size (based on Ins2 expression in Amyot *et al* 2012 [1]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 11, standard deviation: 4 (control) and 1 (treatment).

Sub goal 3: The effect of (translocating) bacteria on immune cells of pancreatic islets.

*9 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 180*

Power analysis performed suggests performing 9 mice to achieve significance. Group size (based on IL-6 release of pancreas resident macrophages in Nackiewicz *et al*, 2014 [8]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 1.7, standard deviation: 0.8 (control) and 1.4 (treatment).

Sub goal 4: The effect of (translocating) bacteria on the protein-cell interaction in pancreatic islets.

*10 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 200*

Power analysis performed suggests using 10 mice to achieve significance. Group size (based on macrophage infiltration in pancreatic islets of lean or obese mice in Agudo *et al*, 2012 [9]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 0.45, standard deviation: 0.02 (lean) and 0.43 (obese).

Sub goal 5: The role of previously identified genes (sub goal 2) in the response to (translocating) bacteria with the aid of gene knockout mice models.

*3 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 60*

Power analysis performed suggests using around 3 mice per treatment to achieve recommended minimal amount of animals. Group size (based on insulin secretion from pancreatic islets in wild-type or TLR4^{-/-} mice; Li *et al*, 2012 [10]): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 1.4, standard deviation: 0.14 (lean) and 0.28 (obese).

Sub goal 6: The effect of (translocating) bacteria on pancreatic islets on DIO treated mice.

*11 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 220*

Power analysis performed suggests using 11 mice to achieve significance. Group size (based on IL-6 secretion in Ehses *et al*, 2007 [7]; lean mice vs. diet induced obesity mice): Significance value: 0.05, power of the study: 80%, difference in means: 950, standard deviation: 670 (control) and 782 (treatment).

Sub goal 7: Identification of immunogenic compounds from (translocating) bacteria, which induce the inflammatory response and subsequently, the insulin secretion loss.

*5 mice per group * 2 groups (control vs. heat-inactivated bacteria) * 10 (different bacteria or bacterial components) = 100*

Power analysis performed suggests using 5 mice to achieve significance. Group size (based on unpublished data; insulin secretion of control islets vs. 10^2 CFU heat-inactivated bacteria treated islets): Significance value: 0.05, power of the study: 0.8, difference in means: 54.38, standard deviation: 26.9 (control) and 9.7 (treatment).

Animal number according to power analysis: 940 mice (approx. 15.7 animals per month over a time period of 5 years).

References

- [1] J. Amyot, M. Semache, M. Ferdaoussi, G. Fontés, and V. Poitout, "Lipopolysaccharides Impair Insulin Gene Expression in Isolated Islets of Langerhans via Toll-Like Receptor-4 and NF- κ B Signalling," *PLoS One*, vol. 7, no. 4, Apr. 2012.
- [2] T. Vatanen et al., "Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans," *Cell*, vol. 165, no. 4, pp. 842–853, May 2016.
- [3] Q. Zhang et al., "Cell coupling in mouse pancreatic β -cells measured in intact islets of Langerhans," *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, vol. 366, no. 1880, pp. 3503–3523, Oct. 2008.
- [4] E. R. Unanue, "Macrophages in endocrine glands with emphasis on pancreatic islets," *Microbiol Spectr*, vol. 4, no. 6, Dec. 2016.
- [5] U. S. Pettersson, T. B. Waldén, P.-O. Carlsson, L. Jansson, and M. Phillipson, "Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 9, p. e46057, Sep. 2012.
- [6] D. Nackiewicz et al., "TLR2/6 and TLR4-activated macrophages contribute to islet inflammation and impair beta cell insulin gene expression via IL-1 and IL-6," *Diabetologia*, vol. 57, no. 8, pp. 1645–1654, Aug. 2014.
- [7] J. A. Ehses et al., "Increased Number of Islet-Associated Macrophages in Type 2 Diabetes," *Diabetes*, vol. 56, no. 9, pp. 2356–2370, Sep. 2007.
- [8] S. Choudhury, S. Ghosh, P. Gupta, S. Mukherjee, and S. Chattopadhyay, "Inflammation-induced ROS generation causes pancreatic cell death through modulation of Nrf2/NF- κ B and SAPK/JNK pathway," *Free Radic. Res.*, vol. 49, no. 11, pp. 1371–1383, 2015.
- [9] J. Agudo et al., "Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Islet Hypervascularization and Inflammation Contribute to Progressive Reduction of β -Cell Mass," *Diabetes*, vol. 61, no. 11, pp. 2851–2861, Nov. 2012.
- [10] J. Li et al., "TLR4 is required for the obesity-induced pancreatic beta cell dysfunction," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 45, no. 12, pp. 1030–1038, Dec. 2013.
- [11] S. Nishimura et al., "Adipose Natural Regulatory B Cells Negatively Control Adipose Tissue Inflammation," *Cell Metab.*, Oct. 2013.
- [12] J. D. Carter, S. B. Dula, K. L. Corbin, R. Wu, and C. S. Nunemaker, "A Practical Guide to Rodent Islet Isolation and Assessment," *Biol Proced Online*, vol. 11, pp. 3–31, Dec. 2009.

B. The animals

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

Species: mouse

Origin: commercial providers, collaborating research groups

Age: Range 4 to 12 weeks.

Gender: The experiments described in this proposal will only make use of male animals. Our main objective is to study the role of gut bacteria in development of type 2 diabetes. In order to do so, one of the requirements is to have a validated model (=male mice) with known drivers for disease development. Only under these conditions, it will be possible to study the additional role of bacteria. Since female mice generally respond differently to diet-induced obesity compared to males (e.g. 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 [1]. It is not within the scope of our proposed research to include the optimization and standardization of new animal models, new diets, new disease phenotypes, new measurement techniques and new surgeries. Use of female mice would require validation, optimization and standardization of all procedures and thus

exponentially increase the mouse numbers needed for this project proposal.

We will start with wild-type C57BL/6 mice to confirm our findings from our collaborators that bacterial treatment is decreasing insulin secretion *in vitro*, but only in a complex cell structure such as pancreatic islets (with immune cells). After confirmation and investigation of molecular mechanisms (gene and protein expression), we will use genetically modified mice such as Toll-like receptor (TLR) knockout mice to confirm the role of specific molecular markers. We will use mice at different ages, but prefer to use them at an age of 3 months to ensure a good yield and quality of islets.

References

[1] U. S. Pettersson, T. B. Waldén, P.-O. Carlsson, L. Jansson, and M. Phillipson, "Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue," PLOS ONE, vol. 7, no. 9, p. e46057, Sep. 2012.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement: Cell lines do not have sufficient complexity for what we are aiming to measure (no immune cells). Pancreatic organoids do not have immune cells and are very expensive to maintain [1]. Human islets are very expensive to obtain and are rarely available. There is no way to obtain healthy pancreatic tissue slices from human since the pancreas is very deeply embedded in the abdomen and is susceptible to an inflammatory process after performing an incision. Therefore, we depend on murine islets.

Reduction: Using 'Go' and 'No-go' criteria, 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. Well-trained, experienced technicians, postdocs and PhD-students will carry out all procedures. This will significantly reduce failure of experimental procedures (and thereby loss of animals). Last, our power analysis suggests already the optimal number of animals to achieve significance. Experiments from different sections of this proposal are going to be combined if possible to reduce mouse numbers.

Refinement: Mice will be acclimatized prior to the experiments and 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. All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and PhD-students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals.

References

[1] P. H. Dedhia, N. Bertaux-Skeirik, Y. Zavros, and J. R. Spence, "Organoid Models of Human Gastrointestinal Development and Disease," Gastroenterology, vol. 150, no. 5, pp. 1098–1112, May 2016.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

Mice will be housed in groups, young littermate mice will be housed and kept together from day of arrival in animal facility. We will work with male mice that sometimes fight. However, we do not expect to see much fighting since we will keep these mice only for a short period of time (up to 2 weeks) until they are going to be sacrificed for islet isolation. Nevertheless, this will be closely monitored and aggressors will be separated from the groups in case of severe fighting. There will be only mild discomfort for the animals since they will be anesthetized prior to the procedure. All procedures will be carried out and supervised by well-trained, experienced technicians, postdocs and PhD-students. This will significantly reduce complications and unnecessary stress on the animals. Inexperienced participants to the studies will receive training with animals intended for educational purposes (oefenprotocol) prior to joining the experiments.

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.

Repetition and duplication

E. Repetition

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

G. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

There will be no adverse effects since the animals will be euthanized before the procedure. We will make sure that animals are housed in groups and with enough enrichment. The discomfort level is `mild` since the animals will be sacrificed prior to isolation.

Explain why these effects may emerge.

As mentioned, no such effects.

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

As mentioned, no adverse effects.

J. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures, which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question K.

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe').

The level of discomfort is `mild` for wild-type animals since the animals will be euthanized before islet isolation. Mild discomfort is expected for DIO mice. The discomfort of gene knock-out mice depends on the mice model.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Mice have to be killed before the islets isolation procedure.

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

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

Yes

- Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager nvt
- 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) nvt
- 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.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
>ja
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag ~~/een wijziging op een bestaande vergunning.~~
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 hoofddoelstelling (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de rol van darm microbiota op de ontwikkeling van diabetes type 2 met de focus op de migratie van bacteriën naar eilandjes van Langerhans in de pancreas) met twee subdoelvragen:

- A) Wat is het effect van (verplaatsende) bacteriën op de beta cel functie in de pancreas (de insuline productie)?;
- B) Wat is het effect van (verplaatsende) bacteriën op de ontstekingsstatus van de eilandjes van Langerhans?

De subdoelen zijn tijdsafhankelijk en dragen allen bij aan de hoofddoelstelling. Eerst zal subdoel A behaald worden voordat subvraag B beantwoord zal worden. Subdoel A bestaat op zijn beurt weer uit verschillende subdoelen: Dit maakt de aanvraag tot een toetsbaar en navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op de ervaring van deze onderzoekers met deze onderzoekslijn en de eerdere samenwerking met andere onderzoekers om de isolatie van eilandjes van Langerhans te leren.

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Wet Natuurbescherming).
>nvt

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoeelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van bacteriën op het verslechteren van de beta cel functie in de pancreas en naar de inflammatoire status van de pancreas. Het onderzoek is ook translationeel omdat deze rol van bacteriën in een model voor diabetes type 2 bestudeerd wordt.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel (het verkrijgen van mechanistisch inzicht in de rol van darm microbiota op de ontwikkeling van diabetes type 2 met de focus op de migratie van deze bacteriën naar eilandjes van Langerhans in de pancreas) heeft een directe en reële relatie met het uiteindelijke doel (het verbeteren van de behandelmethoden voor diabetes type 2). Al zal de toepassing van deze behandelmethode in de verre toekomst liggen en niet binnen dit project gehaald worden, acht de DEC het onderzoek naar deze strategie noodzakelijk en gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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 I voor voorbeeld*)

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de rol van verplaatsende darmbacteriën naar de eilandjes van Langerhans, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten met diabetes type 2.

Deze kennis zou voor (toekomstige) patiënten met diabetes type 2 kunnen bijdragen aan een betere therapie. De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood worden om de weefsels te verzamelen. De behandeling vindt echter geheel *in vitro* plaats en zal verder geen stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren. De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij mogelijk patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

Er is geen aanleiding om te twijfelen aan het afwezig zijn van effecten op het milieu, zoals beschreven in de aanvraag.

Proefopzet en haalbaarheid

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

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

De kennis en kunde van de onderzoekers worden geborgd door de ruime ervaring van de onderzoeksgroep met deze onderzoekslijn. Ze hebben ervaring met het beschreven obesitasmodel (DIO muizen) en hebben de eilandjes isolatie techniek reeds operationeel.

8. 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 beoordeling toe. (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen gesteld binnen het project. Het gehele project wordt uitgevoerd met eilandjes van Langerhans die geïsoleerd worden uit de pancreas, waarna in-vitro de verschillende onderzoeksvragen onderzocht zullen worden. Er zijn verschillende Go/No Go momenten opgenomen waarbij een logische strategie wordt aangehouden. De onderliggende mechanismen of mogelijkheden voor interventie worden pas onderzocht als eerder gebleken is dat de bacterie stam inderdaad de insuline productie onderdrukt.

Welzijn dieren

9. 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 of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling 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. De cervicale dislocatie wordt uitgevoerd onder anesthesie (ook al zou dit niet eens noodzakelijk zijn aangezien de muizen minder dan 150 gram wegen).

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe.

Er wordt voldaan aan bijlage III.

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*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 meent dat deze inschatting juist is. De meeste dieren zullen "licht" ongerief ondergaan omdat de dieren gedood worden om de eilandjes te kunnen isoleren. De DIO muizen die gebruikt worden ondergaan een licht ongerief door hun fenotype. Van de verschillende KO muizen zou er mogelijk ongerief op kunnen treden door het fenotype, maar dit is nog onbekend.

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat er sprake is van vermindering of ontneming van soort-specifieke eigenschappen.

13. 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 beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Er is geen humaan eindpunt gedefinieerd. De enige handeling aan het dier is het doden om de eilandjes te verkrijgen. Er wordt daarom niet verwacht dat er zich situaties voor kunnen doen die het definiëren van een humaan eindpunt nodig is. De DEC vindt deze inschatting juist.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De aanvrager geeft aan dat cellijnen of pancreas organoids niet geschikt zijn door het ontbreken van immuuncellen. Humane eilandjes van Langerhans zijn zeer moeilijk te verkrijgen. Gezien de vraagstellingen van de aanvrager vindt de DEC het aannemelijk dat de proeven daarom in muizen eilandjes verricht moeten worden.

15. 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. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Het aantal dieren is realistisch ingeschat op basis van statistische methoden. Er is een voorlopige power berekening gedaan om de aantallen te schatten voor de verschillende subdoelen. Daarnaast voorkomen de verschillende Go/No Go momenten dat er onnodig dieren gebruikt zullen worden.

16. 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 beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC oordeelt dat het project in overeenstemming is met de vereisten van verfijning van dierproeven en dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd omdat:

- 1) de proeven uitgevoerd worden op geïsoleerde eilandjes van Langerhans en de dieren zelf geen handelingen ondergaan;
- 2) de DIO muizen of KO muizen die mogelijk ongerief ondergaan door hun fenotype pas gebruikt worden als er een duidelijke aanwijzing is uit eerdere proeven dat deze vraagstelling relevant is;
- 3) de muizen worden gedood (cervicale dislocatie) onder anesthesie.

17. 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. Licht uw beoordeling toe.

nvt

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. 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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Er wordt in dit onderzoek alleen gebruik gemaakt van mannelijke dieren. De aanvrager onderbouwt deze keus wetenschappelijk in voldoende mate. Het diabetesmodel wordt in mannelijke dieren uitgevoerd omdat de vrouwelijke muizen minder gevoelig zijn voor het ontwikkelen van ontsteking in het vetweefsel, glucose intolerantie, hyperinsulinemia en hypertrofie van de eilandjes. De mannelijke muis is daarom veel beter geschikt voor dit onderzoek.

19. 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 richtlijn 2010/63/EU. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling 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 gedood in het kader van het project. De dieren worden gedood om de eilandjes van Langerhans te isoleren.

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.

nvt

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
Ja, de NTS is een evenwichtige weergave van het project.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).
Rechtvaardigt het onderzoeken van de rol die de translocatie van bacteriën naar de pancreas kan spelen in het ontstaan van diabetes het gebruik van 940 muizen en het lichte ongerief dat deze 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 onderzoeken van de rol van migrerende bacteriën naar de pancreas op het ontstaan van diabetes type 2, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit (toekomstige) patiënten met diabetes type 2. Deze kennis zou op langere termijn kunnen bijdragen aan een hierop gerichte therapie.

De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat ze gedood worden om de weefsels te verzamelen. De behandeling vindt echter geheel in vitro plaats en zal verder geen stress en/of pijn veroorzaken in de proefdieren.

De andere groep belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat het onderzoek hun carrière mogelijkheden vergroot door publicaties en mogelijke patenten op nieuwe bevindingen kunnen verkrijgen.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van de patiënten. De inzichten die dit onderzoek zullen opleveren, kunnen op termijn een bijdrage leveren aan een betere behandeling of in het voorkomen van de ontwikkeling van diabetes type 2. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 940 muizen licht ongerief ondergaan doordat ze gedood worden voor het gebruik van hun weefsels of doordat hun fenotype licht ongerief veroorzaakt, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het wetenschappelijk belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen. Het maatschappelijk belang van dit projectvoorstel is dat er meer inzicht komt in de rol die naar de pancreas migrerende bacteriën kunnen spelen in het ontstaan van diabetes type 2. De toepassing van deze inzichten zal echter nog jaren

op zich laten wachten en ligt buiten dit projectvoorstel.

De DEC waardeert de vermeerdering van de fundamentele kennis over de rol van migrerende bacteriën, die in humane weefsels al zijn aangetoond, in het ontstaan van diabetes type 2, als het meest zwaarwegende gevolg dat tegen het lichte ongerief van maximaal 940 muizen opweegt.

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 I voor voorbeeld*).

Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie

De DEC is van mening dat het belang van het onderzoeken van de rol die migrerende bacteriën van de darm naar de pancreas spelen in het ontstaan van diabetes type 2, het lichte ongerief van maximaal 940 muizen, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd. In dit onderzoek zal eerst onderzocht worden of een bacteriestam de insuline productie in bètacellen kan onderdrukken. Als dit zo blijkt te zijn, wordt het onderliggende mechanisme verder onderzocht. Ook wordt bekeken of een interventie de productie kan herstellen en of bètacellen uit muizen met obesitas een andere respons laten zien. De uitkomsten van dit onderzoek kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een therapie die gericht is deze invasie van bacteriën in de pancreas. Een dergelijke therapie of vaccinatie zou de grote ziektelast die diabetes meebrengt voor de patiënt en de maatschappij terug kunnen dringen. De DEC onderschrijft het nut van het onderzoeken van deze mogelijkheid.

Om dit doel te bereiken zullen muizen gebruikt worden. Het lichte ongerief dat de muizen ondergaan, wordt veroorzaakt doordat ze gedood worden voor het verzamelen van hun weefsels (eilandjes van Langerhans), of in het geval van de diabetes (DIO) muis of een KO muis kan ook het fenotype van de muis een licht ongerief veroorzaken. De onderzoeksstrategie is logisch en navolgbaar en bevat verschillende Go/No Go momenten. Deze Go/No Go stap borgt dat de vervolgvragen in een geschikte experimentele conditie worden uitgevoerd en voorkomt onnodig proefdiergebruik indien de bacterie geen effect zou hebben op de insuline productie. De DEC is van mening dat alle onderzoeksvragen bijdragen en noodzakelijk zijn voor het behalen van de uiteindelijke doelstelling. De DEC onderschrijft de mening van de aanvrager dat er geen proefdiervrije alternatieven zijn voor het onderzoeken van deze vraagstellingen. De proeven worden zo verfijnd mogelijk uitgevoerd omdat de dieren zelf geen behandeling ondergaan met bacteriën. De dieren worden enkel gebruikt als donor voor de benodigde eilandjes van Langerhans. De blootstelling aan bacteriën wordt vervolgens *in vitro* uitgevoerd in geïsoleerde eilandjes van Langerhans.

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling 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 de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken door groepsgrootte berekeningen te verrichten met data verkregen uit eerdere experimenten. 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*).

Dit DEC advies is 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*).

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.

Bijlage I: Voorbeelden

De in deze bijlage weergegeven voorbeelden zijn alleen bedoeld om een indicatie te geven van het gewenste antwoord en dienen niet letterlijk overgenomen te worden.

A. Algemene gegevens over de procedure

A7. Voorbeeld: "De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD."

C. Beoordeling (inhoud)

C1. Maak gebruik van de handreiking 'Invulling definitie project' om te bepalen of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Overleg de argumenten waarom dit wel of niet het geval is. Geef hierbij ook aan of 1) de aanvraag als programma of project getypeerd wordt (Een programma omvat meerdere projecten en heeft een hoger gelegen doel, terwijl een project een concrete onderzoeksvraag heeft met in principe één concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat), 2) het project coherent is, waarbij alle dierexperimenten logisch samenhangen en nodig zijn om het beoogde concrete resultaat te bereiken en 3) alle stappen in het project voldoende zijn uitgewerkt en geen onzekerheden bevatten, die voor de ethische toetsing relevant zouden kunnen zijn.

Voorbeeld: "Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project': De verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft."

C4. Voorbeeld: "Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzichten in de mechanismen die ten grondslag liggen aan de ontwikkeling van bot. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingsmogelijkheden die bijdrage aan het herstel van bot na trauma. Het betreft hier een fundamenteel project. Er is binnen dit project geen reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de mechanismen die ten grondslag liggen

aan de ontwikkeling van bot op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. De DEC is van mening dat het directe doel, het verkrijgen van kennis over botontwikkeling, gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.”

- C5. Voorbeeld: “De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele project dat gericht is op de ontwikkeling van een therapie voor de ernstige ziekte X zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënt.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoeker zullen kennis verkrijgen. Ook zal de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en patenten.
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten zal verbeterd worden. Hierdoor zal de kwaliteit van leven verbeterd worden.”
- C9. Het uitgangspunt is dat deze categorieën van dieren, omstandigheden of handelingen niet in dierproeven worden gebruikt. Hier kan alleen van af worden geweken indien er wetenschappelijk is onderbouwd waarom het doel van het project niet kan worden bereikt dan door gebruikmaking van de desbetreffende dieren. Daarnaast gelden er voor elk van de genoemde categorieën specifieke beperkende voorwaarden.

Voorbeeld A: “Er worden dieren uit het wild gebruikt. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd waarom het noodzakelijk is wilde dieren te gebruiken:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden met dieren die speciaal voor onderzoek worden gefokt. De DEC is er verder van overtuigd dat het vangen van de dieren door deskundige personen zal gebeuren waardoor de kans op pijn en lijden beperkt zal worden. Ook is er een dierenarts beschikbaar om de dieren te onderzoeken/behandelen mocht tijdens of na het vangen blijken dat de dieren een slechte gezondheid hebben of gewond zijn geraakt.”

Voorbeeld B: “Er wordt een dodingsmethode gebruikt die niet beschreven staat in bijlage IV van de richtlijn. De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is:..... De DEC is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden indien een in de bijlage IV beschreven methode gebruikt wordt en het dus noodzakelijk is om een alternatieve methode te gebruiken. De DEC is van mening dat de beschreven alternatieve methode, te weten....., een acceptabel alternatief is, omdat.....”

- C12.Voorbeeld: “De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast door de dieren genetisch te veranderen. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid en zullen de dieren individueel gehuisvest worden. Hierdoor zullen de dieren geen natuurlijk gedrag kunnen vertonen.”
- C18.Voorbeeld: “De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft aan dit in het verleden altijd zo te hebben gedaan en wil dit graag op deze wijze voorzetten. De DEC is van mening dat de aanvrager niet in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren. Ook heeft de aanvrager niet kunnen aantonen dat het uitvoeren van het project met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren zal leiden tot een dermate grote variatie dat er aanzienlijk meer dieren gebruikt dienen te worden.

D. Ethische afweging

D2. Voorbeeld A: "Project gericht op ontwikkeling van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte:
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (de samenleving) bevorderd worden: veel voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de proefdieren. Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit leiden tot de ontwikkeling van een vaccin tegen een tot dusverre onbehandelbare ernstige, besmettelijke ziekte waar een grote groep mensen aan lijdt. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden. Om dit doel te bereiken worden dieren gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft."

Voorbeeld B: "Project gericht op het ontwikkelen van een therapie tegen een ziekte waar al veel behandelingsmogelijkheden voor zijn.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: ernstig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel
Waarden die voor patiënten bevorderd worden: weinig voordeel
De DEC is van mening dat de belangen van de proefdieren in dit project zwaarder wegen dan de belangen van en waarden voor de patiënten. De DEC is van mening dat het om een ziekte gaat waar al goede behandelingsmogelijkheden voor zijn, de verwachte winst door een nieuwe behandeling zeer beperkt is en de kans dat de doelstellingen behaald worden zeer klein is. Daartegenover staat het ernstige ongerief dat de dieren zullen ondergaan."

D3. Voorbeeld (Zie D2 voorbeeld A): "De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ontwikkelen van een vaccin voor een ernstige, besmettelijke ziekte. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief van de dieren te beperken en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Hoewel er sprake is van een bijzondere categorie dieren, dodingsmethode niet volgens bijlage IV, heeft de aanvrager in voldoende mate onderbouwd dat de doelstellingen niet anders bereikt kunnen worden. De DEC is van mening dat het gekozen alternatief acceptabel is en niet leidt tot meer ongerief. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat het voor het eerst ontwikkelen van een vaccin tegen ziekte X met als uiteindelijk doel het uitbannen van deze ziekte wereldwijd op de wijze zoals beschreven in dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt."

E. Advies

E2. Voorbeeld: "Het advies is gebaseerd op een meerderheidsstandpunt. Twee van de DEC leden zouden tot een negatief advies komen. Deze leden zijn van mening dat voor dit project de waarden van de proefdieren die in het geding zijn zwaarder wegen dan de waarden van de doelgroep die bevorderd zullen worden. De redenen hiervoor zijn....."



> 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
AVD1180020171185

Bijlagen

2

Datum 21 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 augustus 2017. Het gaat om uw project "Murine pancreatic islet isolation". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1180020171185. 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).

Datum:

21 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020171185

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Postdoc
Afdeling: [REDACTED], Academisch Medisch Centrum,
Amsterdam
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD candidate
Afdeling: [REDACTED], Academisch Medisch Centrum,
Amsterdam
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 oktober 2017
Geplande einddatum: 1 oktober 2022
Titel project: Murine pancreatic islet isolation
Titel niet-technische samenvatting: Muizen-eilandjes van Langerhans isolatie
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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

18 augustus 2017

Datum:

21 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD1180020171185



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



AMC crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT


**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
AVD1180020171185
Bijlagen
2

Datum 21 augustus 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 augustus 2017
Vervaldatum: 20 september 2017
Factuurnummer: 171185
Ordernummer: OVV: 
Kostenplaatsnummer 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1180020171185	€ 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
AVD1180020171185
Bijlagen
1

Datum 11 september 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 17 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Murine pancreatic islet isolation" met aanvraagnummer AVD1180020171185. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). 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 "Murine pancreatic islet isolation" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een vergunning niet langer kan zijn dan 5 jaar.

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 18 mei 2017. 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:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD1180020171185

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

Samen met:


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 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Murine pancreatic islet isolation" met aanvraagnummer AVD1180020171185, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dierexperimentencommissie AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is PhD candidate verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 augustus 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 mei 2017, ontvangen op 17 oktober 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Murine islet isolation				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	940	100% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

Aanvraagnummer:

AVD1180020171185

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:

AVD1180020171185

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:

AVD1180020171185

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.