

Inventaris Wob-verzoek W17-07										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017826	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage animal procedure				x	x		x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Mail verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Verzoek om aanvulling en antwoorden				x		x	x		
9	Advies CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		



24 JAN. 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	10800
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
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>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrech
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	PhD candidate
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 2 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bestudering van het effect van voeding en medicatie op autistisch gedrag
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



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.

Autism spectrum disorder (ASD) is an heterogeneous cluster of severe neurodevelopmental disorders. It is characterized by impairments in social interaction and communication and the presence of stereotyped

behaviours (1). Although the aetiology of ASD is unknown, it is thought that ASD is a multifactorial disorder with a strong genetic component (2,3). A variety of environmental factors are suggested to contribute to ASD development. For example, prenatal exposure to teratogens has been shown to be a significant risk factor for ASD (4). Indeed, maternal use of the anticonvulsant valproic acid (VPA) is associated with the development of ASD in the offspring (5,6,7). The mechanism for VPA-induced symptoms of ASD is still unclear, but several pathways have been proposed. These include attenuation of folic acid metabolism, inhibition of histone deacetylases and increased oxidative stress (8). In search of underlying mechanisms, animal models of VPA-induced autism-like behaviours have been established in rats and mice. In a well-characterized murine model, VPA in utero-exposed mice exhibit developmental and behavioural deficits comparable to those observed in ASD patients, including deficits in social behaviour, stereotyped behaviour, anxiety and impairments in cognition (9,10). Furthermore, observations were more prominent in male offspring compared to female offspring (9,10), which reflects the human situation where a marked male preponderance is observed in ASD patients (11). Disturbances in the immune system are repeatedly reported in various organs of ASD patients. Since ASD is primarily a disorder of the central nervous system, the brain is a major target for immunological research. In post-mortem brains of patients with ASD, marked activation of astroglia and microglia is observed when compared to controls (12,13), indicative of neuroinflammation. Enhanced activation of neuroglia was also observed in various murine models of autism (14,15,16). In addition, enhanced levels of a wide range of cytokines and chemokines were found in the brain (17) and in the cerebrospinal fluid (18) of autistic children, compared to healthy children. This supports the presence of neuroinflammatory conditions in the brain of ASD patients. Peripheral immune abnormalities in autistic individuals have also been reported, including differential monocyte responses to *in vitro* stimulation (19,20), dysfunctional natural killer (NK) cells (21) and altered serum levels of immunoglobulins (22), cytokines (23) and chemokines (24). Immune disturbances have also been observed in the gastrointestinal tract of ASD patients. The presence of gastrointestinal problems in these patients is repeatedly reported in literature and include chronic constipation, diarrhoea and abdominal pain (10). These symptoms have been attributed to changes in gut microflora (25,26), increased intestinal permeability (27) and intestinal inflammation (28).

[REDACTED]

All results will also allow us to better understand the involvement of the gut-immune-brain axis in the development of the disease.

Experiments and results of this project are important for two European project proposals that are or will be submitted in the near future,

[REDACTED]

1. American-Psychiatric-Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Press, Washington DC (2000).
2. A. Bailey, A. Le Couteur, I. Gottesman, P. Bolton, E. Simonoff, E. Yuzda, M. Rutter. Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol. Med.*, 25 (1995), pp. 63–77.
3. S.E. Folstein, B. Rosen-Sheidley. Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.*, 2 (2001), pp. 943–955
4. D. Dufour-Rainfray, P. Vourc'h, S. Tourlet, D. Guilloteau, S. Chalon, C.R. Andres. Fetal exposure to teratogens: evidence of genes involved in autism. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 35 (2011), pp. 1254–1265
5. J. Christensen, T.K. Gronborg, M.J. Sorensen, D. Schendel, E.T. Parner, L.H. Pedersen, M. Vestergaard. Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *Jama*, 309 (2013), pp. 1696–1703
6. S.J. Moore, P. Turnpenny, A. Quinn, S. Glover, D.J. Lloyd, T. Montgomery, J.C. Dean. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J. Med. Genet.*, 37 (2000), pp. 489–497
7. A.D. Rasalam, H. Hailey, J.H. Williams, S.J. Moore, P.D. Turnpenny, D.J. Lloyd, J.C. Dean. Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev. Med. Child Neurol.*, 47 (2005), pp. 551–555
8. A. Ornoy. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?. *Reprod. Toxicol.*, 28 (2009), pp. 1–10
9. S. Kataoka, K. Takuma, Y. Hara, Y. Maeda, Y. Ago, T. Matsuda. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16 (2013), pp. 91–103
10. [REDACTED]
11. E. Fombonne. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J. Clin. Psychiatr.*, 66 (Suppl 10) (2005), pp. 3–8
12. J.T. Morgan, G. Chana, C.A. Pardo, C. Achim, K. Semendeferi, J. Buckwalter, E. Courchesne, I.P. Everall. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol. Psychiatr.*, 68 (2010), pp. 368–376
13. S.H. Fatemi, T.D. Folsom, T.J. Reutiman, S. Lee. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse*, 62 (2008), pp. 501–507
14. U. Ratnayake, T.A. Quinn, M. Castillo-Melendez, H. Dickinson, D.W. Walker. Behaviour and hippocampus-specific changes in spiny mouse neonates after treatment of the mother with the viral-mimetic Poly I: C at mid-pregnancy. *Brain Behav. Immun.*, 26 (2012), pp. 1288–129
15. N.C. Derecki, J.C. Cronk, Z. Lu, E. Xu, S.B. Abbott, P.G. Guyenet, J. Kipnis. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature*, 484 (2012), pp. 105–109
16. C.J. Yuskaitis, E. Beurel, R.S. Joje. Evidence of reactive astrocytes but not peripheral immune system activation in a mouse model of Fragile X syndrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 1802 (2010), pp. 1006–1012
17. X. Li, A. Chauhan, A.M. Sheikh, S. Patil, V. Chauhan, X.-M. Li, L. Ji, T. Brown, M. Malik. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J. Neuroimmunol.*, 207 (2009), pp. 111–116
18. D.L. Vargas, C. Nascimbene, C. Krishnan, A.W. Zimmerman, C.A. Pardo. Neuroglial activation and neuroinflammation in the brain of patients with autism. *Ann. Neurol.*, 57 (2005), pp. 67–81
19. H. Jyonouchi, L. Geng, A. Ruby, C. Reddy, B. Zimmerman-Bier. Evaluation of an association between gastrointestinal symptoms and cytokine production against common dietary proteins in children with autism spectrum disorders. *J. Pediatr.*, 146 (2005), pp. 605–610
20. C.A. Molloy, A.L. Morrow, J. Meinzen-Derr, K. Schleifer, K. Dienger, P. Manning-Courtney, M.

- Altaye, M. Wills-Karp. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J. Neuroimmunol.*, 172 (2006), pp. 198–205
21. A.M. Enstrom, L. Lit, C.E. Onore, J.P. Gregg, R.L. Hansen, I.N. Pessah, I. Hertz-Picciotto, J.A. Van de Water, F.R. Sharp, P. Ashwood. Altered gene expression and function of peripheral blood natural killer cells in children with autism. *Brain Behav. Immun.*, 23 (2009), pp. 124–133
22. L. Heuer, P. Ashwood, J. Schauer, P. Goines, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, L.A. Croen, I.N. Pessah, J. Van de Water. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism Res.*, 1 (2008), pp. 275–283
23. A.M. Manzardo, R. Henkhaus, S. Dhillon, M.G. Butler. Plasma cytokine levels in children with autistic disorder and unrelated siblings. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 30 (2012), pp. 121–127
24. P. Ashwood, P. Krakowiak, I. Hertz-Picciotto, R. Hansen, I. Pessah, J. Van de Water. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav. Immun.*, 25 (2011), pp. 40–45
25. P. Louis. Does the human gut microbiota contribute to the etiology of autism spectrum disorders? *Dig. Dis. Sci.*, 57 (2012), pp. 1987–1989
- [REDACTED]
27. L. de Magistris, V. Familiari, A. Pascotto, A. Sapone, A. Frolli, P. Iardino, M. Carteni, M. De Rosa, R. Francavilla, G. Riegler, R. Militerni, C. Bravaccio. Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 51 (2010), pp. 418–424
28. P. Ashwood, A. Anthony, A.A. Pellicer, F. Torrente, J.A. Walker-Smith, A.J. Wakefield. Intestinal lymphocyte populations in children with regressive autism: evidence for extensive mucosal immunopathology. *J. Clin. Immunol.*, 23 (2003), pp. 504–517
29. D.L. Coury, P. Ashwood, A. Fasano, G. Fuchs, M. Geraghty, A. Kaul, G. Mawe, P. Patterson, N.E. Jones. Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics*, 130 (Suppl 2) (2012), pp. S160–S168
30. .B. Adams, L.J. Johansen, L.D. Powell, D. Quig, R.A. Rubin. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol.*, 11 (2011), p. 22
31. S.E. Levy, S.L. Hyman. Use of complementary and alternative treatments for children with autistic spectrum disorders is increasing. *Pediatr. Ann.*, 32 (2003), pp. 685–691

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?

Based on the results of previous studies the following sub-objectives and research questions are defined:

1. [REDACTED]
2. [REDACTED]

3.

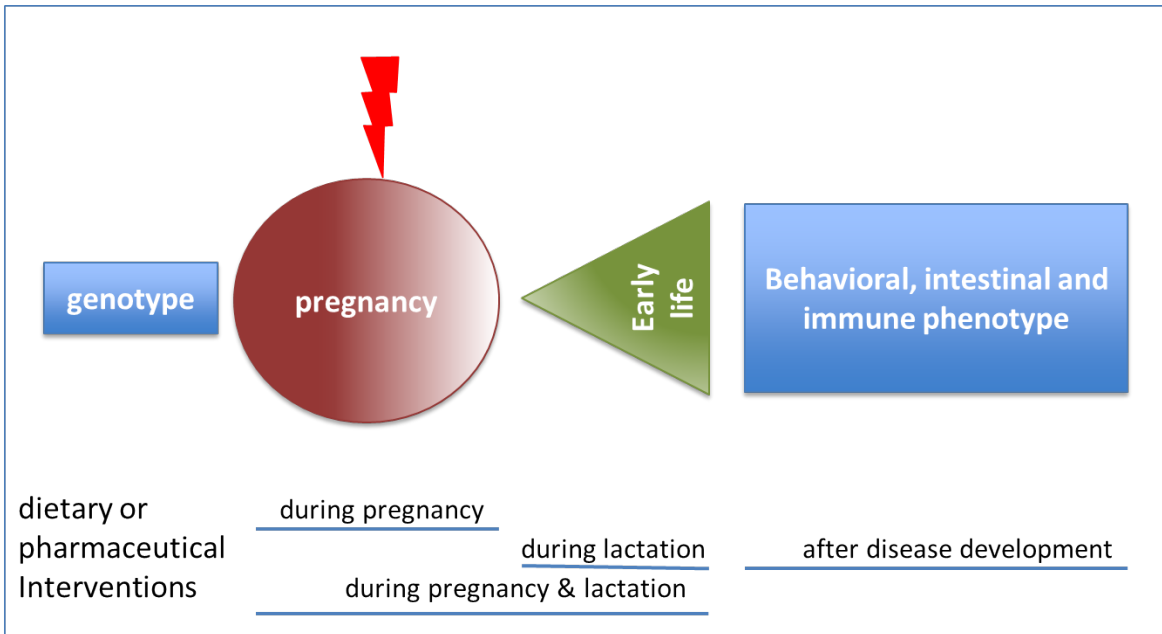


Figure 1. Harmful environmental factors during pregnancy such as valproic acid (VPA) can have permanent effects on the functioning of the brains and behavior later in life and the possibilities of therapeutic interventions in early life and later in life.

The objectives are achievable since:

1. We have an excellent expertise in the field of the gut-immune-brain axis (see references below).
2. The VPA model, described in this application is established and validated.
3. We are well trained on the procedures involved in the study.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

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

3.3 Relevance

What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

According to the literature, the prevalence of ASD has increased 20 times, from a rate around 1: 2500 in the mid-1980s to a rate of 9:1000 at present in the USA (1,2). Although many believe the ASD escalation represents better and earlier diagnosis, improved public awareness and expanding criteria to fulfil the diagnosis, these changes do not appear to adequately account for the rapid rise (3).

ASD patients experience impairments in social interaction and communication and the presence of stereotyped behaviours (4). Immune disturbances have also been observed in the gastrointestinal tract of ASD patients. The presence of gastrointestinal problems in these patients is repeatedly reported in literature and include chronic constipation, diarrhea and abdominal pain (5). All these symptoms have severe impact for the quality of life of the patients themselves and their parents.

There is still little knowledge regarding the environmental factors involved in the gut-immune-brain axis in ASD and there is still no cure for the disease.

The present study might contribute to the knowledge on the underlying mechanisms of ASD [REDACTED]. There is an urgent demand for new strategies regarding ASD prevention and treatment. [REDACTED]

1. Wingate M et al., Prevalence of autism spectrum disorders--Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 14 sites, United States, 2008. *MMWR Surveill Summ.* 2012 Mar 30; 61(3):1-19.
2. Genuis SJ. Is autism reversible? *Acta Paediatr.* 2009 Oct; 98(10):1575-8.
3. Hertz-Picciotto I, Delwiche L. The rise in autism and the role of age at diagnosis. *Epidemiology* 2009; 20: 84–91
4. American-Psychiatric-Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5.* American Psychiatric Press, Washington DC 2013.

3.4 Research strategy

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

[REDACTED]

[REDACTED]

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.

A mouse model for autism (VPA model) will be used to evaluate the competence [REDACTED]. The model has been validated in several studies, including studies performed by our group. Females will be mated until a vaginal plug is detected (day 0). Around gestational day 11, pregnant females are subcutaneously injected with VPA or PBS. The interventions will start before pregnancy or after weaning. Behavioural tests will be conducted throughout the model to evaluate the behavioural modulation of the different dietary components or antibiotics.

Through investigating the following parameters, detailed information about the effects and mechanism of action of the different components can be achieved in the VPA model: changes in behaviour, [REDACTED]

[REDACTED]

These parameters can be investigated in blood and in organs like intestinal tissue, mesenteric lymph nodes, spleen and/or other organs and body fluids.

Previous studies demonstrated that postnatal exposure to [REDACTED], [REDACTED], can affect behavioural parameters related to social, exploratory, and repetitive behaviour in mice (1).

When investigating the behavioural influence of [REDACTED]

[REDACTED] it is essential to not only investigate the effects in diseased state, but also examine the effects in healthy state. By examining the aforementioned parameters in healthy mice receiving an [REDACTED] will give us more insight in the mechanism of action and the similarities and differences in healthy and diseased situations.

1. Dinan TG & Cryan JF. Microbes, immunity and behavior: psychoneuroimmunology meets the microbiome. *Neuropsychopharmacol.*, Jul 2016

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 described segments in the strategy are crucial to evaluate the competence of the dietary components and antibiotics [REDACTED]. By acquiring more knowledge about how these behavioural changes occurs and the effect of the different components on these changes may in the future lead to better a prevention/treatment of

ASD.

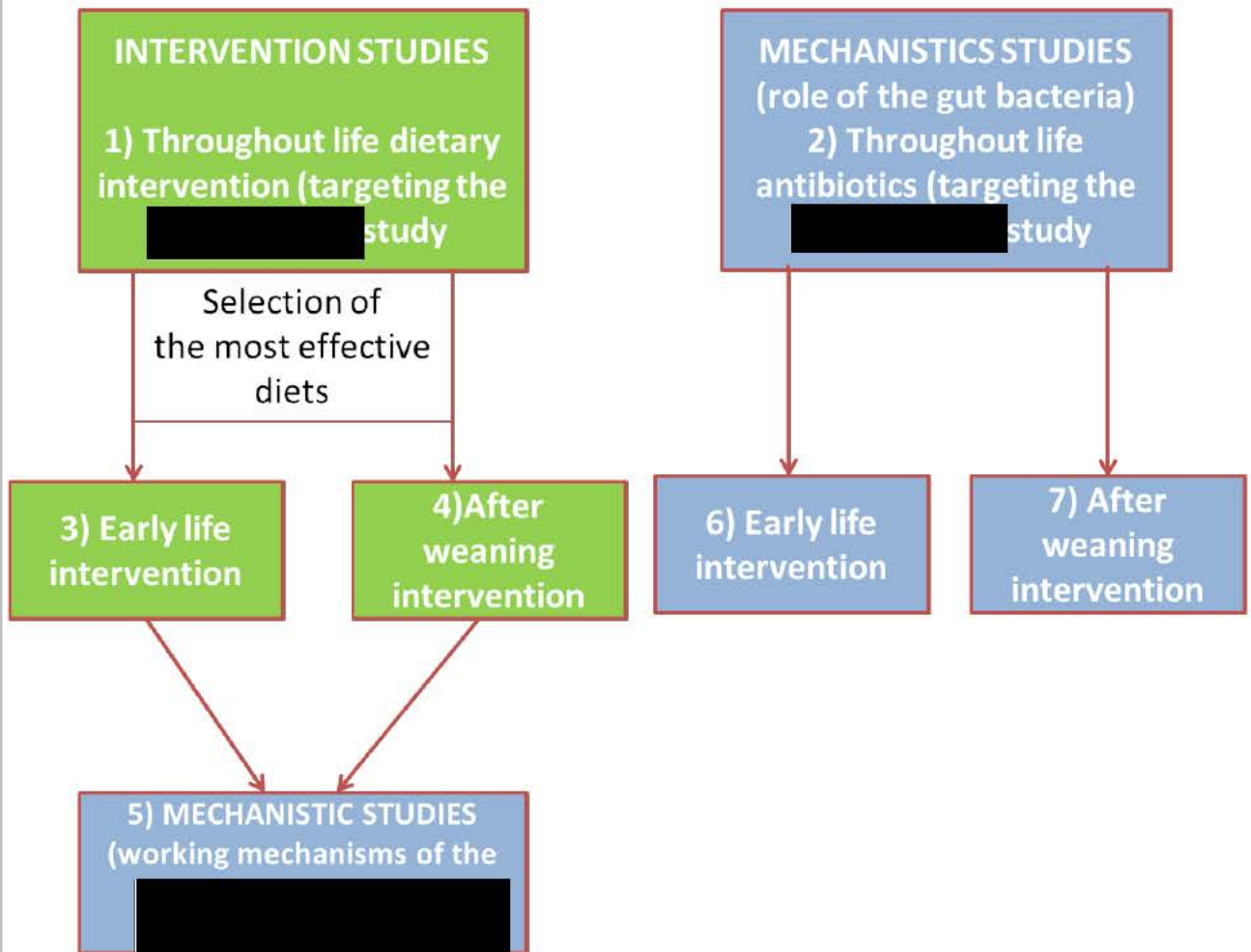


Figure 2: Flow chart of experiments. (Green boxes correspond to the intervention studies, Blue boxes correspond to the mechanistic studies).

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	Valproic acid murine model of autism and the effect of dietary interventions and antibiotics
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	



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'. 10800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Utrecht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 1 | Valproic acid murine model of autism and the effect of dietary interventions and antibiotics |
- 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.

In utero exposure to VPA in mice results in developmental and behavioural deficits in the male offspring comparable to those observed in ASD patients, including deficits in social behaviour, stereotyped behaviour, anxiety and cognition. Moreover, a VPA-induced intestinal phenotype was demonstrated in mice (inflammation and changes in microbiota composition), these symptoms have been also described in ASD patients.

Different behavioural test will be performed during different stages of development to test the effects of different dietary [redacted] and antibiotics.

Primary outcome parameters will be:

- Social behaviour: Ultrasonic vocalisation (UV), social interaction test (SI)
- Exploratory/ anxiety-like behaviour: Marble burying (MB)
- Spatial memory test (SM).

These behavioural tests will be assessed at selected periods after birth (day of birth, P=0), around, P10 (UV; childhood) P30, P45 and P60 (SI, MB, SM; pre-pubescence, pubescence and adulthood,

respectively). Together, the combination of these behavioural tests reliably indicates whether social and exploratory behaviours as well as spatial memory are affected by the diets or the antibiotics.

As we aim to investigate the mechanisms in which our treatments can affect behavioural development, we will use examinations of the brain, the intestinal tract and immune system as secondary outcome measures:

[REDACTED]

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

All female mice will be mated until a vaginal plug is detected, and will be indicated as gestational day 0 (G0). On G11, pregnant females will be treated subcutaneously with either 500mg/Kg VPA or phosphate buffered saline. The [REDACTED] will start before conception or after weaning.

Dietary interventions and antibiotics given throughout life (including pregnancy):

Around 2 weeks before conception females will be [REDACTED] the females will be treated before conception with either [REDACTED] or vehicle through the drinking water. [REDACTED] will continuously be given to lactating dams and offspring throughout the experiment. Female mice will be assigned randomly to control and experimental groups.

Dietary interventions and antibiotics given during early life (during pregnancy and lactation):

2 weeks before conception females will be [REDACTED] the females will be treated before conception with either [REDACTED] or vehicle. [REDACTED] will be continuously be given to lactating dams and offspring till day of weaning (P21). Female mice will be assigned randomly to control and experimental groups.

[REDACTED] given after weaning:

On day 21 after delivery (P21), pups will be weaned and will be [REDACTED] the pups will be treated with either [REDACTED] or vehicle. Nests will be assigned randomly to control and experimental groups.

Behavior will be tested as described below:

Ultrasonic vocalisation will be assessed around day P10 to investigate early life social behaviour. Exploratory and social behaviours and spatial memory test will be assessed at three different time points around: P30, P45, P60 (representing pre-pubescence, pubescence and adulthood, respectively). Together, the combination of these behavioural tests reliably indicates whether social, exploratory behaviours and memory, of healthy mice or hampered by the VPA treatment, are affected/corrected by the [REDACTED].

Isolation-induced ultrasonic vocalizations in pups: The ultrasonic vocalization, or isolation calling,

of infant mice has been studied as a measure of early communicative behavior between a pup and its mother (1). For the induction of isolation-induced ultrasonic vocalizations, around 10 days old pups are separated from mother and littermates under room temperature for 10 minutes. Pups are individually randomly removed from the nest and gently placed into an isolation box made of plastic containing clean bedding material. Emission of ultrasonic vocalizations is monitored by a microphone placed in the roof of the sound attenuating box. The microphone is connected via an amplifier to a personal computer, where acoustic data are recorded with a sampling rate of 250,000 Hz in 16 bit format. The microphone that is used for recording is sensitive to frequencies of 15-180 kHz with a flat frequency response (± 6 dB) between 25-140 kHz (2).

Marble burying test: This test assesses anxiolytic and exploratory behaviour of mice, we expect that VPA-in utero exposed mice will show increased anxiety and decreased exploratory behavior. We expect to modulate this behavior with diets and/or antibiotics. The cage will be filled with approximately 2-3 cm deep wood chip bedding, lightly tamped down to make a flat, even surface. A regular pattern of 20 glass marbles will be placed on the surface, evenly spaced, each about 4 cm apart. One mouse is placed in the cage and left for 30 minutes. The mouse will be undisturbed and potential sources of ultrasound will be eliminated. The number of marbles buried with bedding (to 2/3 of their depth) will be counted (3)(4).

Social interaction: We expect that VPA-in utero exposed mice will show a decrease in social interaction as seen in previous experiments using the same model. We expect to improve social interaction with diets and/or antibiotics. The behavioural assessment used is adapted from a previous description (5). Mice are placed in a 45 × 45 cm open field, with 2 small perforated Plexiglas cages (10 cm diameter) located against opposite walls allowing visual, olfactory and minimal tactile interaction. Mice are habituated to the open field for 5 min and an age- and gender-matched healthy unfamiliar target mouse is introduced in one of the cages for an additional 5 min. By using video tracking software (EthoVision 11, Noldus), an interaction zone around the 2 cages is digitally determined to measure time spent in the interaction zones, latency until first occurrence in the interaction zones and total distance moved.

Spatial memory test

We expect that VPA-in utero exposed mice will show a decrease in cognitive impairment (decreased spatial memory). We expect to improve cognition with diets and/or antibiotics.

Mice ability to react to a spatial novelty after a 3 min delay is measured. Mice are individually submitted to seven consecutive, 6-min sessions. During session 1 (S1), mice are placed into the empty open field. During sessions 2–4 (S2–S4), five objects will be present, and mice will be placed into the apparatus to allow them to habituate to the apparatus and to the objects configuration (habituation phase). During the 3-min intersession interval, the animals were returned to a waiting cage located inside the test room. During the spatial test session (S5), the objects configuration was changed by moving two objects (displaced objects, DO) and leaving the other three objects in the same position (non-displaced objects, NDO). After the spatial test session in both experiments, animals were submitted to two additional sessions: 6 and 7, with an intersession interval of 3 min. In session 6, the configuration of the objects was kept unchanged as compared to S5. In the last session (session 7), one of the familiar objects was replaced by a new object (substituted object, SO); the other four objects were left unchanged (non-substituted objects, NSO). In all sessions, locomotor activity was recorded by counting the number of sector crossings. From sessions 2 to 7, object exploration was evaluated on the basis of the mean time spent by the animal in contact with the different objects. A contact was defined as the snout of the subject actually touching an object. Habituation to objects exploration was assessed by averaging the duration of contacts with the five objects during sessions 2, 3, and 4 in each group. The animals' ability to selectively react to the spatial change was analyzed by calculating the spatial re-exploration index ($DO [S5] - DO [S4] = DO$ and $NDO [S5] - NDO [S4] = NDO$) (6).

In a limited number of studies, the following readouts can be added to the protocol: intestinal permeability, muscle function tests (grip strength) at the end of the experiment.

Intestinal permeability

Intestinal permeability will be detected after administration (by oral gavage) of a test inert substances (for example fluorescent FITC-labeled dextrans). Between 1 and 6 hours after intake 1 blood sample will be drawn by cheek puncture for detection of probe levels in the serum. Measurements of the intestinal permeability are very important. An increase in intestinal permeability might lead to an increase in bacterial translocation, an increase in the immune response and oxidative stress that might ultimately lead to changes on behaviour and immune function.

Additional mechanistic studies to gain knowledge on the mode of action of the [REDACTED]

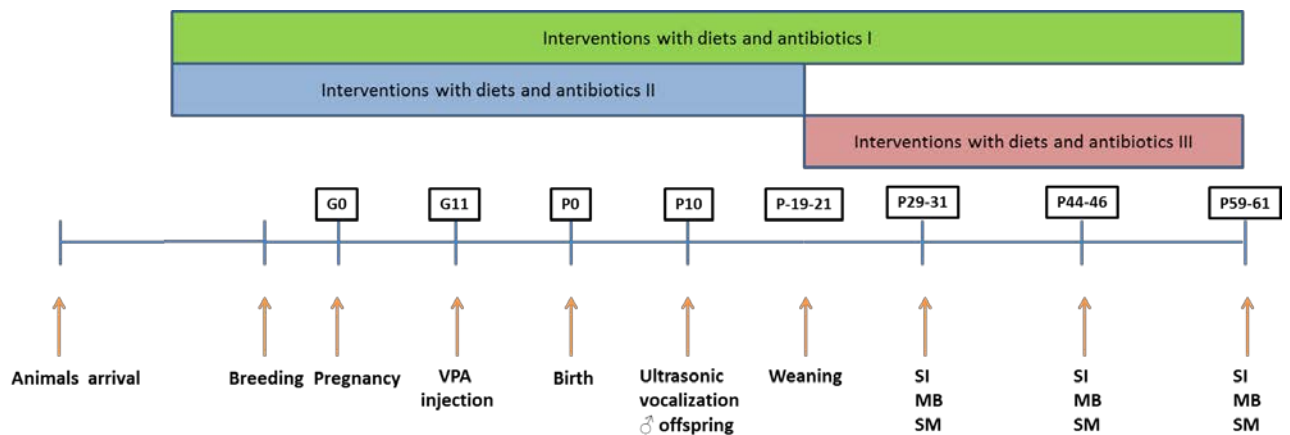


Figure 1. Experimental design. Valproic acid:VPA; gestation: G; days after birth: P; social interaction test: SI; marble burying test: MB; spatial memory test: SM

1. Hofer MA et al. (2002) Ultrasonic vocalizations in rat and mouse pups. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 8:Unit 8.14.
2. Spink AJ et al. (2012) *Proceedings of Measuring Behavior. 8 th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research*
3. Njunge K & Handley SL (1991) Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 38(1):63-7
4. Deacon, RMJ (2006) Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols.* 1(1):122-4.
5. Liu J et al. (2012) Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci.* 15(12):1621-3.
6. De leonibus E. et al. (2007) Spatial deficits in a mouse model of Parkinson disease. *Psychopharmacology (Berl).* 194(4):517-25

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

- The number of animals needed in each group will be calculated by using a power calculation method, based on the primary parameters, including data from previous studies. Experience has taught us that our group size for VPA studies generally is between 8 – 12 animals per group
- During the project, the calculations will be fine-tuned based on most recent data available from the already conducted experiments from the project in order to ensure we use the minimal necessary number of animals and that we apply a well-monitored reduction strategy.
- Whenever multiple questions (test interventions) will be tested in one study, the power-calculation will be discussed with a statistics expert (in consultation with the animal welfare body).
- Serial experiments will be performed in phases, to enable the use of data from the first

experiment to further optimize the following experiment(s) (power calculation, go-no go, etc.).

B. The animals

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

For these studies, BALB/c mice from a registered breeding laboratory in the EU will be used.

For breeding purposes the same amount of males and females will be ordered. We know from previous experiments that only 50% of the females get pregnant and that every nest contains on average 2 male pup (We will try to increase the breeding success by acquiring measures previously discussed with the IvD and the technicians from the gdl). **At the day of weaning male offspring will be housed in randomly assigned groups of 6 male mice per cage and each cage will be assigned for a certain treatment.** For our studies we want to use only the male offspring that will be randomly assigned to the different experimental groups. The deficits in social behavior, stereotyped behavior, anxiety and impairments in cognition as well as the intestinal phenotype (decrease in intestinal epithelial integrity, increase infiltration of immune cells) after VPA injection has been shown to only affect the male offspring (1,2), which reflects the human situation where a marked male preponderance is observed in ASD patients (3).

By using *in vitro* studies, previous preclinical experiments and literature/patent search 6 different [REDACTED] are selected for testing in the VPA model, separately and in different combinations. In addition, 2 [REDACTED]

The interventions with the nutritional components are given before pregnancy and for the duration of the experiments (mother and pups), before pregnancy until weaning (mother) or after weaning (pups).

The intervention should be tested both a healthy and VPA affected mice since previous studies in our lab have indicated that the tested [REDACTED] might also effect the behaviour of the healthy mice.

1. A typical [REDACTED] experiment could consist of the following groups

Control pups (not exposed to VPA)

- Control [REDACTED]
- Intervention 1
- Intervention 2
- Intervention 3
- Mix intervention 1, 2 and 3

Pups exposed during pregnancy to VPA

- Control [REDACTED]
- Intervention 1
- Intervention 2
- Intervention 3
- Mix intervention 1,2 and 3

With a maximum of 12 animals in each group we expect to use 120 pups per experiment. The expected number of breeders 120 females are needed (only 50% of the females get pregnant and every nest contains on average 2 male pups) leading to a total of 240 mice.

- We expect to test different [REDACTED] in 4 of the above/or comparable experiments with interventions throughout life.
- After testing all components, depending on outcome of the first experiments, selected 4 diets will

be tested at a 2 different [REDACTED] starting points (e.g. early life or starting after weaning): 2 of the above/or comparable experiments.

We expect to use a maximum of $240 \times 4 + 240 \times 2 = 1440$ animals

2. A typical experiment with pharmacological interventions to gain insight in the mechanism of [REDACTED] (by using, for example, SCFA receptors and TLRs receptors) could consist of the following groups

Pups (either controls or exposed to VPA in utero)

- Control [REDACTED] and vehicle treatment
- Control [REDACTED] and drug treatment
- Active [REDACTED] intervention and vehicle treatment
- Active [REDACTED] intervention and drug dose 1
- Active [REDACTED] intervention and drug dose 2
- Active [REDACTED] intervention and drug dose 3

With a maximum of 12 animals in each group we expect to use 144 pups per experiment. The expected number of breeders 144 females are needed (only 50% of the females get pregnant and every nest contains on average 2 male pups) leading to a total of 288 mice.

- We expect to test the 1 [REDACTED] intervention protocol depending on outcome of previous experiments (the most promising [REDACTED] intervention).
- We expect to test 3 antibiotics experiments

We expect to use a maximum of $288 \times 3 = 864$ animals

3. A typical experiment with [REDACTED] could consist of the following groups

Control pups (not exposed during pregnancy to VPA)

- Vehicle treatment
- Antibiotic dose 1
- Antibiotic dose 2
- Antibiotic dose 3

Pups exposed during pregnancy to VPA

- Vehicle treatment
- Antibiotic dose 1
- Antibiotic dose 2
- Antibiotic dose 3

With a maximum of 12 animals in each group we expect to use 96 pups per experiment. The expected number of breeders: 96 females are needed (only 50% of the females get pregnant and every nest contains on average 2 male pups) leading to a total of 192 mice.

- We expect to test the 2 antibiotic intervention in 3 doses in 2 of the above/or comparable experiments with interventions throughout life.
- The most effect antibiotic will be tested a 3 doses at a 2 different starting points (e.g. early life or starting after weaning).

We expect to use a maximum of $192 \times 2 + 192 \times 2 = 768$ animals

The total number of mice maximally used for the whole project will be $1440 + 864 + 768 = 3072$ animals

Surplus mice: female pups (they do not develop autistic like behaviour) ,non-pregnant females and half of the mothers (saline-injected) will be available for re-use.

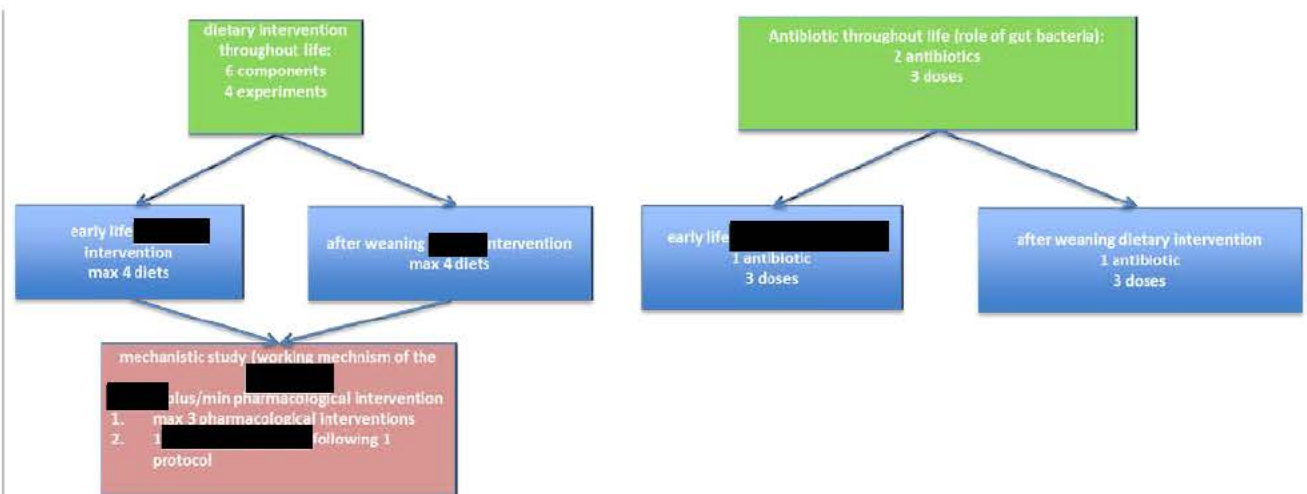


Figure 2. Flow chart of experiments.

1. S. Kataoka et al. Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 16 (2013), pp. 91–103
2. [redacted]
3. E. Fombonne. Epidemiology of autistic disorder and other pervasive developmental disorders. *J. Clin. Psychiatr.*, 66 (Suppl 10) (2005), pp. 3–8
4. Sandler et al 2000 Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol.* (2000) Jul;15(7):429-35.
5. Kumar H et al. Minocycline ameliorates prenatal valproic acid induced autistic behaviour, biochemistry and blood brain barrier impairments in rats. *Brain Res.* (2016) Jan 1;1630:83-97.

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.

The experimental strategy described taking into account principles of replacement, reduction and refinement. Because of the complexity of gut to brain signalling, it is not possible to investigate the effects of [redacted] on brain development and behaviour only in an *in vitro* set-up.

The effects of the [redacted] has already been investigated in the past for bacteria and in cell systems. On the basis of these results, the composition of the [redacted] interventions will be determined. There are no side effects expected from the [redacted]. However, all the animals will be checked daily. Group size will be calculated using a defined relevant effect size and a prior obtained within-group variance, taking Bonferroni correction into account for multiple comparisons. This power calculation will

be based on behavioural parameters that have been measured repeatedly in our department under similar conditions as in these studies. Whenever possible, we will combine studies that use the same control groups. In this way we can reduce the number of animals used, but we will make sure that the likelihood of success will not be compromise. To optimize wellbeing of the animals, animals will be housed in groups in an enriched environment.

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

General clinical signs (fur condition, posture, behavior, etc.) are observed daily. When clinical signs indicate severe discomfort animals will be euthanized.

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?

Stress

Explain why these effects may emerge.

Stress may result from handling and exposure to the behavioural tasks

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

We set-up the animal model before, using the minimum dose of VPA. Treatment and behavioural experiments are conducted by an experienced researcher.

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.

General clinical signs (fur condition, posture, behavior, etc.) are observed daily. When clinical signs indicate severe discomfort animals will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

< 2 %

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').

Mothers:

VPA injection: mild

Saline injection: mild

Dietary intervention: none

Intervention with antibiotics (oral): mild

Off spring:

Behavioural tests: mild

Dietary intervention: none

Intervention with antibiotics (oral): mild

In a limited number of studies, the following readouts in the off spring can be added to the protocol: intestinal integrity: mild

The cumulative discomfort level of the procedures in one experiment will not exceed mild discomfort level.

Based on the accumulation of the discomfort induced by described procedures and the duration of the experiments we estimate the discomfort to category mild.

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.

We need to collect the organs and tissues (brain, intestinal tract etc) and analyse them to get substantial data on the role of the gut-immune-brain axis in ASD. For these experiments, animals will be sacrificed by decapitation to obtain the intact brain without prior sedation by appropriately trained handlers, because the use of sedatives has been reported to alter gene expression and intracellular signaling pathways in the brain (Hughes and Dragunow, 1995 Pharmacol. Rev. 47: 133).

VPA treated mothers (cannot be used as surplus mice) will be sacrificed by an overdose of anaesthesia.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017826

Bijlagen

2

Datum 17 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 januari 2017. Het gaat om uw project "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017826. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

17 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017826

Datum:
17 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017826

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 februari 2017
Geplande einddatum: 1 februari 2022
Titel project: The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice.
Titel niet-technische samenvatting: Bestudering van het effect van voeding en medicatie op autistisch gedrag
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1035,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 11 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017826
Bijlagen
2

Datum 17 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 17 januari 2017
Vervaldatum: 16 februari 2017
Factuurnummer: 170826
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017826	€

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.

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 9 februari 2017 10:50
Aan: [REDACTED]
CC: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Onderwerp: vragen bij de behandeling van AVD108002017826

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen aan u. Het betreft uw project; The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice, met aanvraagnummer AVD1080002017826.

De titel op de NTS komt niet overeen met de titel van de NTS in het aanvraagformulier. De titel van het project spitst zich toe op de muis, terwijl u beoogd om translationeel onderzoek te doen en de beschrijving van de achtergrond onder 3.1 van het projectvoorstel zich ook toespitst op de humane situatie. Kunt u de titel heroverwegen en meer algemeen stellen.

Kunt u controleren of de juiste versie (aangepast op basis van DEC advies) van de bijlage dierproeven is ingediend? Op basis van het advies van de DEC zou bij de Humane Eindpunten het gewicht als parameter verwijderd zijn, en zou er meer specifiek beschreven zijn dat nestgenoten niet bij elkaar in een experimentele groep gehuisvest worden.

Gebaseerd op het feit dat mannelijke nestgenoten niet in dezelfde experimentele groep worden ingedeeld en dus niet bij elkaar gehuisvest worden: hoe voorkomt u dat dieren solitair worden gehuisvest? Is uw fokschema zodanig dat er binnen een bepaald tijdsbestek dieren worden geboren en gezamenlijk worden gespeend? Verklaart dit ook voor een deel het relatief lage foksucces?

U beschrijft dat u dat veranderde microbiota een uitleesparameter is voor uw project, de uitleesparameters hiervoor worden niet duidelijk uit de beschrijving van de experimentele handelingen. Meet u de microbiota samenstelling alleen bij terminatie van het experiment of doet u ook tussentijds een meting door bijvoorbeeld feces te verzamelen?

De behandeltijd van uw project is opgeschort totdat wij de antwoorden hebben ontvangen. Uw project staat op de agenda voor de CCD vergadering van 17 februari, wij willen u vragen voor die tijd de aanvullingen aan ons toe te sturen,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (let op: nieuw emailadres!)

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Bij de behandeling hiervan hebben wij nog een aantal vragen aan u. Het betreft uw project; The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice, met aanvraagnummer AVD1080002017826.

1. De titel op de NTS komt niet overeen met de titel van de NTS in het aanvraagformulier. we have changed it accordingly. De titel van het project spitst zich toe op de muis, terwijl u beoogd om translationeel onderzoek te doen en de beschrijving van de achtergrond onder 3.1 van het projectvoorstel zich ook toespitst op de humane situatie. Kunt u de titel heroverwegen en meer algemeen stellen.

We have changed the title now in: The gut-immune-brain axis in ASD: transnational studies of the effects of dietary components and antibiotics

2. Kunt u controleren of de juiste versie (aangepast op basis van DEC advies) van de bijlage dierproeven is ingediend? Op basis van het advies van de DEC zou bij de Humane Eindpunten het gewicht als parameter verwijderd zijn, en zou er meer specifiek beschreven zijn dat nestgenoten niet bij elkaar in een experimentele groep gehuisvest worden.

The weight as a parameter has been removed and a better description is included now about group housing.

3. Gebaseerd op het feit dat mannelijke nestgenoten niet in dezelfde experimentele groep worden ingedeeld en dus niet bij elkaar gehuisvest worden: hoe voorkomt u dat dieren solitair worden gehuisvest? Is uw fokschema zodanig dat er binnen een bepaald tijdsbestek dieren worden geboren en gezamenlijk worden gespeend? Verklaart dit ook voor een deel het relatief lage foksucces?

Directly after weaning the male offspring will be house randomly in groups of 6 mice per cage and each cage will be assigned for a certain treatment. This information has been included.

We do not make a strict scheme with a short period for all the animals to be born or weaned. We understand it is very difficult. We also do not believe our breeding success is low. We discussed it with animal caretakers from our animal facilities as

well as breeding companies and it turned out that our breeding success for this strain is OK.

4. U beschrijft dat u dat veranderde microbiota een uitleesparameter is voor uw project, de uitleesparameters hiervoor worden niet duidelijk uit de beschrijving van de experimentele handelingen. Meet u de microbiota samenstelling alleen bij terminatie van het experiment of doet u ook tussentijds een meting door bijvoorbeeld feces te verzamelen?

Fecal samples will be collected at different timepoints during the experiment to measure SCFA (microbiome activity). At the end of the experiment, cecum content will be analyzed to measure the microbiome composition. This information has been added.

De behandel tijd van uw project is opgeschort totdat wij de antwoorden hebben ontvangen. Uw project staat op de agenda voor de CCD vergadering van 17 februari, wij willen u vragen voor die tijd de aanvullingen aan ons toe te sturen,

Met vriendelijke groet, 



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002017826

Bijlagen

1

Datum 20 februari 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice." met aanvraagnummer AVD108002017826. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben u een aantal vragen voorgelegd. Op basis van deze antwoorden heeft u de documenten van uw aanvraag herzien.

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 "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice." starten. De vergunning wordt afgegeven van 21 februari 2017 tot en met 1 februari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Dit advies is opgesteld op 5 januari 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:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017826

Bezwaar

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

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


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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 21 februari 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary components and antibiotics in male mice." met aanvraagnummer AVD108002017826, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 5 januari 2017, ontvangen op 16 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Valproic acid murine model of autism and the effect of dietary interventions and antibiotics				
	Muizen (Mus musculus) / balb/c	3.072	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:

AVD108002017826

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.

Voorschriften

In afstemming met de IvD worden maatregelen onderzocht om het foksucces waar mogelijk te optimaliseren zodat het hoger dan 50% is.



Aanvraagnummer:

AVD108002017826

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:

AVD108002017826

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.858.023
2. Titel van het project : The gut-immune-brain axis in ASD: effects of dietary and pharmacological components
3. Titel van de NTS : Het effect van beïnvloeding van de darmflora op het afweersysteem, de hersenen en gedrag bij autisme

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht

Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247

Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 10-10-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 24-10-2016 en 16-11-2016
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 31-10-2016/07-11-2016 en 22-11-2016/12-12-2016
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 05-01-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 16-11-2016
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 7 DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager: vo onderzoeker + PI
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:

Het doel wordt door de onderzoekers nog steeds omschreven van als een interventiestudie in plaats van als een mechanistische studie. Maar de interventie is een middel voor mechanistisch onderzoek. Onderzoekers beamen dat het fundamenteel onderzoek is waarbij met interventies mechanistische studies worden gedaan. Het doel zal worden aangepast.

De DEC vraagt zich af of er ook samenwerking/contact is met de kliniek. Hierover staat niets in het projectvoorstel. Onderzoekers geven aan dat er een klinische trial gaande is in mensen en dat dit is genoemd in het projectvoorstel. Daarnaast noemen zij dat er wel samenwerkingen/connecties zijn, maar niet specifiek voor dit project. Wel kunnen ze het grotere geheel van samenwerking/consortium weergeven. De DEC raadt de onderzoekers aan dit op te nemen in het projectvoorstel. Het is belangrijk om connecties te noemen, zeker wanneer er parallellen zijn met humaan onderzoek. Het onderzoek kan dan beter in het geheel geplaatst worden.

De onderzoekers blijven bij een fokresultaat van ca. 50%. De DEC is van mening dat een hoger fokresultaat mogelijk moet zijn en raadt de onderzoeker aan contact op te nemen met de IvD om samen met hen te onderzoeken wat de reden is van dit matige percentage, hoe hoog dit percentage landelijk is en welke maatregelen eventueel genomen kunnen worden om dit percentage omhoog te brengen. Daarnaast raadt de DEC de onderzoekers aan om de link naar een artikel van Jackson van 20 jaar geleden te verwijderen, omdat dit geen goede afspiegeling is van de huidige situatie hier.

Met betrekking tot de keuze voor het gebruik van mannelijke dieren vraagt de DEC zich af of het klopt dat valproïnezuur geen effect heeft op het gedrag van vrouwtjes of dat het meer prominent aanwezig is in mannetjes? Onderzoekers geven aan dat het humaan meer prominent aanwezig is bij mannen dan bij vrouwen en het bij vrouwelijke muizen zelfs helemaal niet wordt gezien in het fenotype. De DEC raadt de onderzoekers aan om dit duidelijk weer te geven in het projectvoorstel en '*much more prominent*' te wijzigen of aan te geven dat het over mensen gaat. Tevens raadt de DEC de onderzoekers aan om toe te lichten waarom het toch een goed model is als het alleen in mannen werkt.

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

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 31-10-2016
- Datum antwoord: 07-11-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U meldt dat er een groot klinisch onderzoek gestart is. De DEC vraagt zich af of u van plan bent om deze gegevens te gebruiken in deze proefopzet en kan daar een go/no go aan vast geknoopt worden zodat u duidelijk in de aanvraag kunt laten zien wat de relatie is tussen wat u bij de mens vindt en hier wilt doen (backwards translation). *In the described approved clinical trial, researchers are going to use only one specific probiotic mixture in pre-schoolers with ASD. We are not involved in any way with this clinical trail. In our pre-clinical trial we aim to investigate the effects of different combinations of components targeting the microbiome () and we start the interventions at different time points (throughout life, during pregnancy and lactation and after weaning). Therefore, though results from the presented clinical trail will be of great value for our study, we can not back translate their finding to our preclinical trial*

since the interventions are very different. Maybe the sentence was a bit confusing. It has been removed.

- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de achtergrond anders op te bouwen. Graag eerst aangeven wat al bekend is over autisme, wat u vervolgens aanvult met de resultaten uit eigen onderzoek, gevolgd door literatuur (niet alleen verwijzen, maar ook kort benoemen). Vervolgens geeft u aan wat nog mist en wat u met dit onderzoek verder wilt onderzoeken.

The last part of the background has been changed according to your comments.

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert om niet te spreken over farmacologische beïnvloeding maar over beïnvloeding van de microbiota d.m.v. antibiotica.

It has been changed.

- 3.2 Doel: In de visie van de DEC dient het doel anders geformuleerd te worden, namelijk niet primair als interventie onderzoek, maar als fundamenteel onderzoek met mogelijke translatie mogelijkheden naar de mens. Immers de meerwaarde van het onderzoek is het mechanistische deel terwijl de interventie studie ook direct bij de mens kan worden uitgevoerd. Graag wijzigen.

It has been added.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Er worden wel mechanistische studies gedaan bij de effectieve [REDACTED] maar niet bij de interventies met de antibiotica. Als u mooie effecten ziet bij de [REDACTED] waarom kijkt u dan niet ook mechanistisch bij de antibiotica?

As we explained now in the last paragraph, the use of antibiotics is part of the mechanistic studies to investigate the importance of the intestinal bacteria in the valproic acid-induced intestinal phenotype and autism-like behaviour in mice. In addition, to antibiotics, we also want to possibly study other pharmacological interventions to examine the effects of [REDACTED]

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC raadt u aan de takken van onderzoek in figuur 2 anders te benoemen. U kunt wellicht beter spreken over antibiotica (rechter tak) en [REDACTED] [REDACTED] Zoals het nu is afgebeeld wordt de lezer op het verkeerde been gezet omdat deze verwacht dat het gaat om beïnvloeding op hersenniveau door de farmacologische interventies. Het doel is echter de aanpassing van het microbioom door antibiotica dan wel [REDACTED] en het microbioom beïnvloed uiteindelijk al in de baarmoeder de ontwikkeling van de hersenen.

Figure 2 has been changed.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: Vlak boven figuur 2 staat de zin: *The pharmacological treatment will contain mainly antibiotics that will also affect the microbiota.* 'Mainly antibiotics' suggereert dat iets anders ook mogelijk is. Graag toelichten of verwijderen.
The sentence has been deleted.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het werkt verhelderend indien u nog aangeeft wat u bij de testen verwacht te zien. Wat is precies de uitleesparameter?
What we expect from the primary outcome parameters has been added where the behavioural test are described.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Figuur 1 in de bijlage (tijdsbalk) is zwart en dus niet goed te lezen.
Figure 1 has been changed.
- B. De dieren: U geeft aan dat het fokresultaat 50% is. Dit is aan de lage kant want bij de Balb/c ligt het gemiddelde normaliter rond de 80-90%. Ook de nestgrootte van 4-5 pups is aan de lage kant. De gemiddelde nestgrootte is 6-7 pups. De DEC raadt u aan om bij de fokker na te vragen wat historische data zijn, want de DEC neemt geen genoegen met deze fokresultaten. Indien het eigen fok betreft dan dient de fokmethodiek geoptimaliseerd te worden.
We indicated that breeding success is 50% according to the experience from our group with Balb/c mice in our animal facilities, it has been reported to be even below 50% (<http://www.informatics.jax.org/silver/tables/table4-1.shtml>). We also experienced that the average litter size is 4-5 pups, and it has been previously reported to be 5.2. (<http://www.informatics.jax.org/external/festing/mouse/docs/BALB.shtml>)
- B. De dieren: Er worden man/vrouw metingen gedaan, maar dat zou een haremparing kunnen zijn, wat veel mannetje bespaart. Eén mannetje kan bij 2 tot 5 vrouwen gezet worden. Als de vrouwtjes langer bij elkaar zitten gaan ze synchroniseren en is met behulp van een uitstrijkje te zien wanneer ze ovuleren. Indien dit een eigen fok is dan klopt de fokmethodiek niet en dient dan verfijnd worden. Graag uw reactie.
Indeed 1 male can mate with several females. According to the people from our group with expertise regarding breeding in Balb/c mice. 2 females per male works best. We will then need only half of mating males. However the amount of male breeders is not included in the DEC application. According to the IVD we do not need to include male breeders.
- B. De dieren: De DEC vraagt zich af of de fokvrouwen opnieuw gebruikt worden?
Half of the mothers (saline-injected) will presented to the animal lab as surplus animals.
- B. De dieren: U geeft aan dat de 'onset' 80% is in mannen. Bent u van plan, indien u een effectieve behandeling vindt bij mannelijke dieren, om het experiment te herhalen in de vrouwelijke muis? Daarnaast is de genetische aanleg, die bij de mens aanwezig is bij de expressie van autisme, in het muismodel niet aanwezig. Waarom zouden vrouwen niet ook autistisch zijn in het muizenmodel? Wellicht heeft u deze gegevens al, zo ja dan opnemen in de aanvraag. Graag uw visie.
According to previous experiments from our group, the male VPA-exposed offspring shows reductions in social interaction and intestinal alterations. Female VPA in utero-exposed mice, on the contrary, did not display behavioural or intestinal alterations when compared to control females. Therefore, we do not intent to repeat the experiments in female mice. The enigma of the male bias in ASD remains unsolved. Not only in humans, but also in

preclinical rodent studies, effects of prenatal immune activation and maternal stress on neurodevelopment and behaviour are strongly sex dependent. Programming of the sexually dimorphic brain is determined by exposure to testosterone and oestrogen that affect cell differentiation, migration, survival and connectivity. VPA inhibits the conversion of testosterone to oestradiol, which could explain the sex-specific neurodevelopmental effects of VPA. Furthermore, it is suggested that oestrogen and progesterone provide protection against the neurotoxic effects of VPA by enhancing anti-oxidant mechanisms, making females less vulnerable.

- B. De dieren: De twee mannelijke pups uit één nest (volgens uw eigen berekening) mogen niet in dezelfde groep komen. De DEC verzoekt u dit toe te voegen aan de opmerking dat de groepen random worden ingedeeld.

It has been changed in B.

- B. De dieren: Figuur 2: Welke farmacologische interventies worden gedaan bij de mechanistische studies? Of betreft het alleen antibiotica?

As described above, we want to use different antibiotic intervention to mechanistically study the importance of intestinal bacteria and the consequence of timing of antibiotic-induced intestinal bacteria depletion/changes. In addition, to antibiotics, we also want to possibly study other pharmacological interventions to examine the effects of [REDACTED]

- J. Humane eindpunten: U geeft aan dat de muizen pas bij ernstig ongerief gewogen worden. De DEC acht dit veel te laat. Daarnaast is de DEC er geen voorstander van om het lichaamsgewicht als parameter te nemen, want het bepalen van gewichtsafname bij drachtige muizen is lastig. De DEC geeft de voorkeur aan klinische observaties en raadt u aan het wegen als parameter te verwijderen.

It has been changed.

- L. Wijze van doden: De DEC vraagt zich af wat gebeurt er met de dekmannen, de fokvrouwen, de vrouwelijke pups, etc. Graag voor alle groepen dieren toelichten wat na afloop van het experiment met hen gebeurt.

Breeding mothers injected with saline and breeding males will be presented to the animal lab for use as surplus mice. VPA-treated mothers will be sacrificed by an overdose of anaesthesia.

- L. Wijze van doden: Decapitatie is geen methode volgens de EU Directive en moet derhalve gemotiveerd worden.

According to the annex IV of Directive 2010/63/EU decapitation might be used if other methods are not possible. For these experiments, animals will be sacrificed by decapitation to obtain the intact brain without prior sedation by appropriately trained handlers, because the use of sedatives has been reported to alter gene expression and intracellular signaling pathways in the brain (Hughes and Dragunow, 1995 Pharmacol. Rev. 47: 133).

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Hier graag refereren naar wat voor onderzoek er al in mensen loopt en dat de voorliggende aanvraag een mechanistisch en voor wat betreft de interventies, een proof of principle studie is. Tevens dient ook hier het doel anders en scherper geformuleerd te worden.

A reference of an overview of clinical studies is added: Uit een overzicht van lopende klinische studies op het gebied van autisme blijkt dat er vooral farmacologische stoffen getest worden (<https://www.centerwatch.com/clinical-trials/listings/condition/612/autism>).

The word "medicatie" is replaced by "antibiotica".

The purpose of the study is described in more detail:

1. *Door middel van dit onderzoek willen we testen of veranderingen in de darmflora door voedingsmiddelen of antibiotica van invloed zijn op autistisch gedrag en darmproblemen.*
 2. *Onderzoek in het darmweefsel, het immuunsysteem en de hersenen zal meer inzicht geven in de rol van de darmflora.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 22-11-2016

- Datum antwoord: 12-12-2016

- Gestelde vragen en antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: In uw antwoord heeft u aangegeven 'medicatie' te hebben vervangen door 'antibiotica', maar de DEC vindt dit geen goede vervanging en verzoekt u hier nogmaals naar te kijken.
We have check the NTS and changed accordingly.

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: in het doel is het project nog steeds als een interventiestudie omschreven, terwijl het fundamenteel onderzoek is waarbij met interventies mechanistische studies worden gedaan. De DEC adviseert u het doel te wijzigen zodat dit duidelijk wordt.

The purpose has been adapted.

- 3.1 Achtergrond: De DEC ziet graag dat u het grotere geheel van samenwerking/consortium weergeeft in het projectvoorstel, zodat het voorliggende project beter in het geheel geplaatst kan worden.

Experiments and results of this project are important for two European project proposals that are or will be submitted in the near future, [REDACTED]

2.

[REDACTED]

Bijlage 1

- B. De dieren: De DEC blijft van mening dat een fokresultaat van 50% aan de lage kant is en raadt u aan om contact op te nemen met de IvD en om samen met hen te onderzoeken wat de reden is van dit matige percentage, hoe hoog dit percentage landelijk is en welke maatregelen eventueel genomen kunnen worden om dit percentage omhoog te brengen. Daarnaast raadt de DEC u aan om de link naar het artikel van Jackson van 20 jaar geleden te verwijderen, omdat dit geen goede afspiegeling is van de huidige situatie hier.

We agree and we would of course like to increase the breeding success. We will discuss with the IVD as well as with the technicians from the animallab in order to take measures to increase that rate. The link has been removed.

- B. De dieren: De DEC raadt u aan om duidelijk in het projectvoorstel op te nemen dat het effect van valproïnezuur bij de mens meer prominent is bij mannelijke nakomelingen dan bij vrouwelijke. Bij muizen wordt het effect uitsluitend gezien bij de mannelijke nakomelingen. De term '*much more prominent*' graag wijzigen of aangeven dat het over mensen gaat. Daarnaast raadt de DEC de onderzoekers aan om toe te lichten waarom het toch een goed model is als het alleen in mannen werkt.

It has been adapted.

ASD is extremely heterogeneous in its etiology and presentation of symptoms, which gives it the umbrella term 'Spectrum Disorders'. While it is impossible for the VPA animal model of autism (or any other animal model) to recapitulate the entire set of signs and symptoms found in individuals with ASD, it is an invaluable tool for deciphering the highly-intricate functioning of the human brain and in rushing the discovery of valid treatments.

This model demonstrated many of the structural and behavioral features that can be observed in individuals with autism. These similarities enable the model to define relevant pathways of developmental dysregulation resulting from environmental manipulation. The uncovering of these complex pathways resulted to the growing pool of potential therapeutic candidates addressing the core symptoms of ASD.

Mabunga DF, Gonzales EL, Kim JW, Kim KC, Shin CY. Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism. Exp Neurobiol. 2015

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.
Met de term Autisme Spectrum Stoornissen (hierna kortweg aangeduid als 'autisme') wordt een heterogeen cluster van ontwikkelingsstoornissen aangeduid dat gekenmerkt wordt door afwijkende sociale interactie, afwijkende communicatie en door stereotiep gedrag. Autisme is een veel – en steeds vaker – voorkomende aandoening die een grote invloed heeft op de kwaliteit van leven van zowel de patiënten (vaak kinderen) als hun omgeving. Verschillende omgevingsfactoren kunnen het ontstaan van autisme induceren. Een bekend voorbeeld is de maternale blootstelling aan het anti-epilepticum valproïnezuur (VPA), welke in verband gebracht wordt met de ontwikkeling van autisme in nakomelingen – zowel in mensen als in muizen. De etiologie van autisme in het algemeen, en van VPA-geïnduceerd autisme in het bijzonder, is nog niet geheel opgehelderd. Er zijn wel duidelijke aanwijzingen dat de darmflora en interacties tussen darm-immuunsysteem-hersenen hierin een belangrijke rol spelen (veel patiënten hebben ook last van een afwijkende darmfunctie). Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager daarom in muizen nader in kaart brengen wat de invloed is van de darmflora op de ontwikkeling van autisme, en onderzoeken of het mogelijk is om het tot expressie komen van het ziektebeeld van autisme te voorkomen of te beperken door op darmniveau te interveniëren. Het project is opgedeeld in verschillende type experimenten die zowel parallel aan elkaar uitgevoerd worden als ook op elkaar volgend. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen wordt in figuur 2 uit bijlage 1 weergegeven en is in feite een combinatie van de voorbeelden 2 en 4B uit de 'Handreiking Invulling Definitie Project'.
2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het vergaren van fundamentele kennis over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen. Het uiteindelijke doel van het project is het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van farmacologische en [REDACTED] die de darmflora (van moeders en/of kinderen) zodanig kunnen beïnvloeden dat in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld voorkomen of beperkt kan worden. Voordat de werkzaamheid van dergelijke interventies in mensen onderzocht kan worden is het van belang dat een *proof-of-concept* en een onderbouwing van de onderliggende hypothese geleverd wordt met behulp van dierexperimenten. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep (moeders en kinderen), het onderzoeksveld en [REDACTED]. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van een preventieve en/of therapeutische behandeling). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de [REDACTED] worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke en commerciële ontwikkelingen).
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot interacties tussen darm-immuunsysteem-hersenen, met het beschreven diermodel en met de uit te voeren experimentele handelingen en metingen. Het feit dat het onderzoek uitgevoerd wordt in samenwerking met een klinische onderzoeksgroep die werkt op het gebied van [REDACTED] draagt bij aan de haalbaarheid en relevantie van het project.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Met behulp van interventies met verschillende [REDACTED] antibiotica en farmaca worden mechanistische studies uitgevoerd die fundamentele kennis opleveren over de (onderliggende mechanismen van de) invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen. De experimenten kunnen tegelijkertijd een *proof-of-concept* leveren voor de mogelijke preventieve

of therapeutische werkzaamheid van ██████████ In dit project wordt gebruik gemaakt van een goed gekarakteriseerd en gevalideerd model voor VPA-geïnduceerd autisme in muizen. Het project start met twee type experimenten die parallel aan elkaar uitgevoerd worden (interventies met diëten en antibiotica vanaf dracht tot na spenen). Hierna worden de meest veel belovende diëten en één antibioticum geselecteerd voor vervolggexperimenten (interventies gedurende *early life* (dat wil zeggen gedurende dracht en lactatie) en na spenen). Ten slotte worden de meest effectieve ██████████ geselecteerd voor de experimenten die het onderliggende mechanisme van de ██████████ moeten ophelderen (interventies met farmaca die aangrijpen op targets in de darm). De primaire uitleesparameters zijn: sociaal gedrag, exploratief gedrag en ruimtelijk geheugen. Secundaire uitleesparameters zijn met name gericht op de samenstelling en functie van de darmflora, op de darmpermeabiliteit en op (neuro)inflammatie.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren in bijlage 1 geldt dat zij niet meer dan licht ongerief ervaren. Het lichte ongerief is het gevolg van injecties met VPA of saline die noodzakelijk zijn in het kader van het autisme-model (moederdieren), van interventies met antibiotica die noodzakelijk zijn om veranderingen in de samenstelling van de darmflora te bewerkstelligen (moederdieren en nakomelingen), van lichte stress tijdens gedragstesten (nakomelingen), en bloedafnamen voor bepalingen van de darmpermeabiliteit (nakomelingen).
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast door de inductie van autisme, veranderingen in de darmflora en het uitvoeren van gedragstesten (fysieke en gedragsmatige aantasting).
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Het is niet

waarschijnlijk dat dieren ten gevolge van de experimentele handelingen het humane eindpunt bereiken. Toch zijn uit voorzorg een aantal algemene criteria opgesteld waarmee het optreden van onverwacht – en niet aan het experiment gerelateerd – ongerief gemonitord kan worden. Wanneer sprake is van klinische verschijnselen die kunnen wijzen op ernstig ongerief, dan worden de dieren dagelijks gewogen en bij overmatig gewichtsverlies (meer dan 15% binnen twee dagen) geëuthanaseerd. Men gaat ervan uit dat minder dan 2% van de dieren het humane eindpunt zal bereiken.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De deels nog op te helderen interacties tussen cellen, weefsels en organen die ten grondslag liggen aan de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme – en het effect van [REDACTED] hierop – zijn dusdanig complex, dat deze niet volledig *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden. Er zijn weliswaar *in vitro* modellen beschikbaar die bepaalde stukken van het onderliggende mechanisme (deels) kunnen nabootsen, maar ook samen zouden zij slechts een gesimplificeerde weergave van de werkelijkheid bieden, en de onderzoekers niet in staat stellen om de doelstellingen van dit project te behalen. Daar waar mogelijk is vooronderzoek met *in vitro* experimenten uitgevoerd, onder andere naar de effecten van [REDACTED] op het immuunsysteem en de flora van de darm (zie ook C15).
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Met behulp van gegevens uit eerder uitgevoerd vergelijkbaar onderzoek is bepaald welke groeps grootte nodig is om statistisch en biologisch significante verschillen tussen groepen te kunnen detecteren. De berekeningen zijn gebaseerd op gedragsparameters die door de onderzoeksgroep veelvuldig gebruikt worden als uitleesparameters voor vergelijkbare experimenten. Waar mogelijk worden experimenten met elkaar gecombineerd, zodat het aantal controlegroepen gereduceerd kan worden. Op basis van resultaten uit *in vitro* onderzoek zijn de meest veelbelovende (combinaties van) [REDACTED] geselecteerd voor de te onderzoeken [REDACTED]. Daarmee wordt het benodigde aantal experimentele groepen tot een minimum gereduceerd. In de ogen van de DEC zou het wenselijk zijn om het huidige foksucces van 50% te verhogen, zodat het benodigde aantal proefdieren verder gereduceerd kan worden (zie E3).
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de uit te voeren experimentele handelingen en metingen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de fok die beschreven wordt in bijlage 1 worden dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet. Voor de feitelijke experimenten in bijlage 1, welke uitgevoerd worden met de nakomelingen, zullen alleen mannelijke dieren gebruikt worden, omdat zich in het VPA-model het autisme-fenotype uitsluitend in mannelijke nakomelingen manifesteert. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager met dit argument in voldoende mate heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, niet anders kan dan de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden met behulp van uitgebreide analyse van onder andere darm- en hersenweefsel. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het directe doel van het project (het vergaren van fundamentele kennis over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen) en het uiteindelijke doel (het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van farmacologische en ██████████ die in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld kunnen voorkomen of beperken), gezien de hoge waarschijnlijkheid dat de doelstellingen behaald worden, het lichte ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig nadeel. Waarden die voor het onderzoeksveld en de ██████████ worden bevorderd: gering voordeel. Waarden die voor de doelgroep worden bevorderd: veel voordeel. De DEC is van mening dat de belangen van de doelgroep in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. Het feit dat de belangen voor de onderzoeksgroep en de ██████████ door dit project worden bevorderd speelde voor de DEC bij het maken van de ethische afweging geen rol van betekenis. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project fundamentele kennis opleveren over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme. De samenleving zou erbij gebaat zijn wanneer farmacologische en/of ██████████ beschikbaar komen

waarmee in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld voorkomen of beperkt kan worden. Het is aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden, en de onderzoekers doen er alles aan om ongerief voor de dieren tot een minimum te beperken.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het vergaren van fundamentele kennis over de invloed van de darmflora op de ontwikkeling van autisme in muizen met als uiteindelijke doel het leveren van een bijdrage aan de ontwikkeling van farmacologische en [REDACTED] die in kinderen met genetische aanleg voor autisme het tot expressie komen van het ziektebeeld kunnen voorkomen of beperken. De DEC is van mening dat de belangen van de doelgroep zwaarder wegen dan de belangen van de proefdieren. 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 kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project. Het beschreven muizenmodel stelt de onderzoekers in staat de doelstellingen van het project te behalen, maar heeft als beperking dat enkel mannelijke nakomelingen gebruikt kunnen worden. Toch ondersteunt de DEC de keuze voor het VPA-model, omdat de kwaliteit van het model en de transleerbaarheid van resultaten in de ogen van de DEC opweegt tegen het nadeel van het gebruik van één geslacht. Daarnaast acht de DEC het gebruik van enkele mannelijke dieren gerechtvaardigd, omdat het voorliggende project in feite een *proof-of-principle* is. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstellingen te behalen, om te kunnen voldoen aan de 3V-beginselen en om te kunnen voorkomen dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is ook van mening dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om het ongerief en het aantal dieren tot een minimum te beperken. De DEC hecht er wel waarde aan dat de onderzoekers samen met de IvD onderzoeken of en op welke wijze het huidige foksucces van 50% verhoogd kan worden (zie E3). Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het lichte ongerief dat de dieren zullen ondervinden, en dat de doelstellingen het gebruik van proefdieren rechtvaardigen.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

-
-
3. Het volgende dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies: de DEC is van mening dat een foksucces van 50% aan de lage kant is. De DEC heeft de onderzoeker geadviseerd om samen met de IvD te achterhalen of en op welke wijze het foksucces verhoogd kan worden.