

		Inventaris Wob-verzoek W17-07								
			wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.		document NTS 2017843	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1		Aanvraagformulier				x		x		
2		NTS	x							
3		Projectvoorstel				x		x	x	
4		Bijlage animal procedure 1			x					
5		Bijlage animal procedure 2			x					
6		Bijlage animal procedure 3 origineel			x					
7		Bijlage animal procedure 3 aangepast			x					
8		Bijlage animal procedure 4			x					
9		Bijlage animal procedure 5			x					
10		Ontvangstbevestiging						x		
11		Mail verzoek om aanvulling				x		x		
12		DEC advies				x		x		
13		Advies CCD		x						x
14		Beschikking en vergunning				x		x		



Centrale Commissie Dierproeven

31 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>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11800 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	343362777
		Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] ☒ Dhr. ☐ Mw.
		Functie	Principal Investigator/Onderzoeker
		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] ☐ Dhr. ☒ Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 28 - 02 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC | DEC AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 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.

☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1727 Lege

☐ Wijziging € Lege

☐ 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 Amsterdam

Datum 27 - 1 - 2017

Handtekening 



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- ☒ Fundamenteel onderzoek
- ☒ Translationeel of toegepast onderzoek
- ☐ Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- ☐ Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- ☐ Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- ☐ Hoger onderwijs of opleiding
- ☐ Forensisch onderzoek
- ☐ Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

B-lymfocyten hebben verschillende functies binnen het immuunsysteem. Zij produceren onder andere antilichamen, presenteren antigenen aan T-lymfocyten en moduleren immuunreacties door de productie van cytokines¹. B-lymfocyten kunnen echter ook bijdragen aan de ontwikkeling van verschillende auto-immuunziekten, zoals reumatoïde artritis (RA) en multiple sclerose (MS) door onder andere antilichamen te produceren tegen lichaamseigen eiwitten. RA wordt gekenmerkt door chronische ontstekingen van de perifere gewrichten en komt bij ongeveer 1-3% van de bevolking voor. MS is een zeer ernstige auto-immuunziekte van het centrale zenuwstelsel met een prevalentie die varieert tussen de 2 en 150 patiënten per 100.000 personen. Van beide aandoeningen is de oorzaak nog niet bekend.

Wel is aangetoond dat B-lymfocyten een belangrijke rol in de ontwikkeling van RA spelen, aangezien therapie door middel van rituximab (anti-CD20 antilichamen die B-lymfocyten verwijderen) effectief is in patiënten². Het is echter niet bekend of alle B-lymfocyt subsets schadelijk zijn en welke moleculaire signaal systemen betrokken zijn bij de regulatie van verschillende B-cel subsets. Recentelijk is bijvoorbeeld een immuun-remmende, IL-10 producerende regulatoire B-cel subset geïdentificeerd die een rol speelt in verschillende muismodellen van auto-immuniteit en artritis³⁻⁵. In patiënten zijn hoge aantallen IL-10 producerende B-cellen geassocieerd met een lagere ziektescore en ontstekingswaarden in het bloed⁶.

Meer kennis is nodig over de specifieke pathogene en regulatoire (immuun-remmende) B-cel subsets en hun rol in auto-immuunziekten en welke moleculaire signaal systemen hierbij betrokken zijn.

Muis modellen

Voor onze experimenten willen we gebruik maken van een aantal ziektemodellen in de muis, namelijk: collageen-geïnduceerde artritis (CIA) en collageen-antilichaam geïnduceerde artritis (CAIA) als muismodellen voor artritis; en experimentele auto-immuun encefalomyelitis (EAE) als muismodel voor MS.

In het CIA model worden muizen geïmmuniseerd met collageen, wat uiteindelijk resulteert in gewrichtsontsteking door de productie van anti-collageen antilichamen door B-lymfocyten. Met dit model kunnen we de initiatie van artritis goed nabootsen en hiervoor is de antilichaam productie van B-lymfocyten cruciaal.

In het CAIA model worden muizen geïnjecteerd met anti-collageen auto-antilichamen. Dit model is daarmee onafhankelijk van de antilichaam productie van de B-lymfocyten, en om die reden geschikt om andere functies van B-lymfocyten, zoals antigeen presentatie en cytokine productie, in kaart te brengen tijdens de chronische fase van artritis.

In het EAE model worden muizen geïmmuniseerd met MOG eiwit of peptide om respectievelijk B en T, of enkel T cellen te activeren. Uiteindelijk leidt dit tot neuroinflammatie en progressieve verlamingsverschijnselen zoals in MS. Dit ziektemodel is geschikt om de functie van zowel T als B-lymfocyten te onderzoeken en dient als tweede, onafhankelijke model voor auto-immuniteit. In het EAE model zijn vooral de T-lymfocyten de cellen die de ziekteverschijnselen opwekken, de B-cellen spelen een rol door het presenteren van het MOG eiwit aan de T-lymfocyten en deze cellen te ondersteunen in het activatie proces⁷.

Bob1 en auto-immuniteit

Gen expressie analyse van samples afkomstig van RA patiënten en controle patiënten heeft aangetoond dat de transcriptie factor Bob1, de B-cel groeifactor APRIL en 1 van zijn receptoren BCMA sterk geassocieerd zijn met RA. In eerdere experimenten is aangetoond dat Bob1 deficiënte muizen compleet beschermd zijn tegen CIA en dat deze bescherming veroorzaakt wordt door de afwezigheid van Bob1 specifiek in B-lymfocyten.

Beide bevindingen hebben geleid tot onze hypothese waarin we stellen dat Bob1 een belangrijke transcriptiefactor is voor de regulatie van pathogene B-cel responsen in auto-immuniteit.

APRIL en auto-immuniteit

Muizen die de B-cel groeifactor APRIL tot overexpressie brengen zijn deels beschermd tegen CIA en EAE.

Onderzoek in ons laboratorium heeft aangetoond dat APRIL zorgt voor de inductie van IL-10 producerende B cellen. Reductie van deze IL-10-producerende B cellen door middel van peritoneale shock leidt tot een verergering van de CIA, wat tot **de hypothese heeft geleid dat APRIL betrokken is bij de expansie en/of activatie van regulatoire B cellen die immuun responsen kunnen remmen.**

Fc receptoren en auto-immuniteit

In de meerderheid van de RA patiënten maken B lymfocyten auto-antilichamen (antilichamen gericht tegen lichaamseigen structuren). We hebben eerder laten zien dat deze auto-antilichamen door binding aan Fc receptoren op bepaalde immuun cellen (macrofagen) een sterke ontstekingsreactie veroorzaken, gekenmerkt door productie van ontstekingsmediatoren zoals TNF⁸. Een vergelijkbaar effect zien we bij MS patiënten, waar de meerderheid van de patiënten auto-antilichamen heeft tegen myelinedestructuren in de hersenen. Onze preliminaire data met gebruik van humaan post-mortem weefsel laat inderdaad zien dat macrofagen in de hersenen (de zogenoemde microglia) ook geactiveerd worden door antilichamen. **Deze bevindingen hebben geleid tot onze hypothese dat auto-antilichamen, door het activeren van Fc receptoren, sterke ontstekingsreacties veroorzaken in auto-immuunziekten als RA en MS.**

Samengevat zijn B lymfocyten belangrijk voor de ontwikkeling van auto-immuunziekten, zoals RA en MS. Of alle soorten B lymfocyten echter schadelijk zijn, is nog niet bekend. Ook is nog niet bekend hoe de functie en activiteit van verschillende soorten B lymfocyten wordt gereguleerd in patiënten met auto-immuunziekten. In dit project willen we de moleculaire signaal systemen identificeren die zorgen voor de regulatie van B lymfocyt responsen in RA en MS, met daarbij de focus op signalering door drie signaalroutes betrokken bij immuun-activering door B lymfocyten:

1. Bob1 signalering in B en T lymfocyten en de effecten van verhoogde of afwezige Bob1 expressie op de ontwikkeling van CIA/CAIA en EAE.
2. APRIL geïnduceerde regulatoire B lymfocyten en de capaciteit van deze soort B lymfocyten om te beschermen tegen auto-immuniteit. Dit wordt bestudeerd in CIA/CAIA en EAE.
3. Fc receptor signalering in myeloïde cellen zoals macrofagen en het effect hiervan op de ontwikkeling van CIA/CAIA en EAE.

Onderzoek naar deze drie signaalroutes geeft inzicht in de mechanismen die pathogene B cellen aansturen (via Bob1), de manieren waarop regulatoire B cellen ziekte kunnen inperken (via APRIL gemedieerde IL10 productie) en de effecten die B cellen kunnen bewerkstelligen via hun antilichaam productie en de binding van deze antilichamen aan Fc receptoren.

Kennis over de regulatie van B lymfocyten door Bob1, APRIL en Fc receptoren in auto-immuniteit kan leiden tot de ontwikkeling van gerichte therapieën (bijvoorbeeld door APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten te stimuleren en pathogene B lymfocyt subsets te remmen) wat mogelijk bij zal dragen aan een verbetering van het ziektebeeld in RA en MS.

Referenties:

1. Shen, P. and S. Fillatreau, *Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines*. Nat Rev immunol, 2015. **15**(7): p. 441-51.
2. Edwards, J.C., L. Szczepanski, J. Szechinski, A. Filipowicz-Sosnowska, P. Emery, D.R. Close, R.M. Stevens, and T. Shaw, *Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2004. **350**(25): p. 2572-81.
3. Fillatreau, S., C.H. Sweeney, M.J. McGeachy, D. Gray, and S.M. Anderton, *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 944-50.
4. Yanaba, K., J.D. Bouaziz, K.M. Haas, J.C. Poe, M. Fujimoto, and T.F. Tedder, *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.
5. Yang, M., J. Deng, Y. Liu, K.H. Ko, X. Wang, Z. Jiao, S. Wang, Z. Hua, L. Sun, G. Srivastava, C.S. Lau, X. Cao, and L. Lu, *IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation*. Am J Pathol, 2012. **180**(6): p. 2375-85.
6. Daien, C.I., S. Gailhac, T. Mura, R. Audo, B. Combe, M. Hahne, and J. Morel, *Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease*

- activity. *Arthritis Rheumatol*, 2014. **66**(8): p. 2037-46.
7. Bettelli, E., Beaten, D., Jager, A., Sobel, R.A., Kuchroo, V.K., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice*. *J.Clin. Invest.* 2006. **116**(9):2393-402.
8. Vogelpoel, L.T., I.S. Hansen, T. Rispens, F.J. Muller, T.M. van Capel, M.C. Turina, J.B. Vos, D.L. Baeten, M.L. Kapsenberg, E.C. de Jong and J. den Dunnen, *Fc gamma receptor-TLR cross-talk elicits pro-inflammatory cytokine production by human M2 macrophages*. *Nat. Commun.* 2014. **5**(5444).

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

B lymfocyten zijn belangrijk voor de ontwikkeling van auto-immuunziekten, RA en MS. Of alle soorten B lymfocyten echter schadelijk zijn, is nog niet bekend. Ook is nog niet bekend hoe de functie en activiteit van verschillende soorten B lymfocyten wordt gereguleerd in patiënten met auto-immuunziekten. Gebaseerd op onze huidige resultaten (beschreven in paragraaf 3.1) is onze doelstelling het bestuderen van B lymfocyten en (auto-)antilichamen en hun rol in auto-immuunziekten, zoals RA en MS. Onze focus ligt vooral op het bestuderen van de functionele aspecten van de B lymfocyten, zoals antigeen-presentatie, cytokine- en (auto-)antilichaam productie en de regulatie van deze cellen.

Deze doelstelling zal worden uitgewerkt in 3 subdoelen:

1. De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van verhoogde Bob1 expressie op B en T lymfocyt differentiatie en functies.
2. Aantonen dat IL-10, specifiek geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten, een ontstekingsremmende werking heeft en dat een transfer van deze cellen bescherming biedt tegen auto-immuniteit. Ook willen we de onderliggende mechanismen identificeren, die een rol spelen in de regulatoire B lymfocyten geïnduceerd door APRIL.
3. De immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen en de gevolgen hiervan op ontsteking en auto-immuniteit.

Haalbaarheid:

B lymfocyten kunnen schadelijk zijn in auto-immuniteit, maar kunnen mogelijk ook een beschermende, immuun regulerende functie hebben. In onze onderzoeksgroep zijn we geïnteresseerd in het definiëren van verschillende B lymfocyt subsets en hun effector functies. De in deze aanvraag beschreven methoden en diermodellen worden al jaren gebruikt binnen onze groep en onderzoeksinstituut, wat experimentele haalbaarheid garandeert. Tevens beschikt de proefdierfaciliteit van het AMC over de benodigde infrastructuur om de experimenten correct uit te voeren. Gezien onze eerder behaalde resultaten (beschreven in paragraaf 3.1) en onze expertise op dit vakgebied, achten wij de kans groot dat onze doelstellingen behaald worden.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijke belang

B lymfocyten spelen een belangrijke rol in het ontstaan en het in stand houden van auto-immuunziekten. Er is nog onvoldoende bekend over de moleculaire en cellulaire regulatie van B lymfocyten en hun specifieke bijdrage aan auto-immuunziekten. Meer kennis over de verschillende functionele aspecten van B lymfocyten in het ziekteproces en kennis over de moleculaire regulatie van deze cellen is daarom nodig. Mogelijk kan deze kennis bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe strategieën om auto-

immuunziekten in patiënten te behandelen.

Maatschappelijke belang

RA is een ernstige ziekte die van grote invloed is op het dagelijks leven van patiënten en de maatschappij. Hoewel de symptomen goed te behandelen zijn in 50-70% van de patiënten, met veelal dure medicatie, is niet iedereen geholpen met de huidige therapieën. Bovendien is geen van de therapieën in staat om langdurige remissie te bereiken of zelfs te genezen.

MS is een ziekte die vooral jongvolwassenen aandoet, met een zeer ernstig ziektebeeld. Ondanks dat er vooruitgang is op het gebied van behandeling, is het nog niet mogelijk om de exacerbaties waardoor de ziekte gekenmerkt wordt te voorkomen. Ook MS is nog steeds niet te genezen. Daarom is het voor beide ziektes nog steeds belangrijk om te zoeken naar nieuwe vormen van therapeutische interventie. Ons onderzoek richt zich op het in kaart brengen van de rol en moleculaire regulatie van verschillende soorten B lymfocyten in auto-immuniteit, met een focus op de rol van de eiwitten Bob-1 en APRIL en de gevolgen van Fc receptor signalering op ontstekingen en pathogenese. Op dit moment is het onvoldoende bekend hoe deze eiwitten en Fc receptor signalering bijdragen aan de pathogenese van RA en MS, wel is uit eerder onderzoek binnen onze onderzoeksgroep op humaan materiaal en weefsel als ook met dierexperimenteel onderzoek gebleken dat deze factoren veranderd meetbaar zijn in RA. Zodra we meer kennis hebben over de functie en regulatie van verschillende soorten B lymfocyten in auto-immuniteit via Bob-1, APRIL en Fc receptor signalering, zullen wij deze factoren remmen/stimuleren in de muizen als therapie voor RA en/of MS. De uitkomsten uit deze experimenten zullen aantonen of het remmen/stimuleren van Bob-1, APRIL of Fc receptor signalering in RA en MS modellen een mogelijke nieuwe therapie voor RA en/of MS patiënten kan worden. Onze afdeling en onderzoeksgroep heeft een zeer translationeel karakter, waardoor het mogelijk is om interessante, relevante resultaten uit de beschreven dierexperimenten ook te onderzoeken in patiënten via kleine proof-of-concept klinische trials.

Wij achten het wetenschappelijk en maatschappelijk belang groot genoeg om dierexperimenteel onderzoek te rechtvaardigen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De studies worden als volgt opgezet:

Subdoel 1/ De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van Bob1 overexpressie/blokkade op B lymfocyt differentiatie en antigeen-presentatie.

Wij hebben een muis ontwikkeld die het mogelijk maakt om Bob1 overexpressie aan te zetten door middel van een Cre-Lox systeem. Tevens beschikken wij over een Bob1 knock out muis. Wij zullen Bob1 tot overexpressie brengen in onder andere B lymfocyten, maar ook in T lymfocyten die via hun rol als T folliculaire helper lymfocyten de B lymfocyt functie kunnen beïnvloeden. De muizen zullen, in eerste instantie, een half jaar gevolgd worden om te bepalen of zij spontaan (auto-immun)ziekte(n) ontwikkelen. Symptomen van ziekte(n) zullen tijdens die periode in kaart gebracht worden.

Indien deze muizen niet binnen 3 maanden immuun deficiënties vertonen (tekenen van auto-immuniteit, zoals gewichtsafname, diarree, zwelling van de poten etc), zullen we arthritis, dan wel een EAE induceren om te kijken of Bob1 overexpressie deze specifieke ziekten verergert ten opzichte van de ziekte in controle dieren (zonder Bob1 overexpressie). Zo kunnen wij met behulp van het CIA model de rol van Bob1 overexpressie in pathogene B cellen in het ziektebeeld van RA in kaart brengen. Het CIA model is geschikt om de effecten van Bob1 overexpressie op antilichaam productie in kaart te brengen. Deze antilichamen zijn cruciaal voor het induceren van CIA. Het CAIA model zal gebruikt worden om de effecten van Bob1 overexpressie op andere functies van B lymfocyten, zoals cytokine productie en antigeen presentatie, te onderzoeken. Het EAE model zal gebruikt worden om de effecten van Bob1 overexpressie op B en T lymfocyt activatie te onderzoeken.

De Bob1 overexpressie muizen worden vergeleken met wild type muizen en muizen met een Bob1

deficiëntie in ernst van de ziekte en de snelheid waarmee het ziektebeeld zich ontwikkelt. Daarnaast zullen wij *ex vivo* experimenten uitvoeren om verschillen in de functionaliteit van B lymfocyten te bestuderen bij overexpressie, dan wel deficiëntie van Bob1.

Om te bepalen of Bob1 overexpressie belangrijk is in de inductie van ziekte, of pas later in het ziekteverloop, maken we gebruik van het Cre-Lox systeem. Dit systeem maakt het mogelijk om de expressie van genen op een specifiek moment te reguleren. In ons geval brengen we Bob1 tot overexpressie voor of na ziekte inductie.

Subdoel 2/ De rol van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggende mechanisme in deze specifieke B lymfocyten.

Als eerste zullen we onderzoeken of APRIL-overexpressie leidt tot het ontstaan van B lymfocyten met een regulatoir fenotype die beschermen tegen auto-immuniteit. De mogelijk beschermende functie van APRIL-geïnduceerde B lymfocyten zal getest worden in het CIA en CAIA model. Voor dit onderzoek worden wild type muizen en muizen die APRIL tot overexpressie brengen gebruikt. Daarnaast zullen we *ex vivo* de cytokine productie en receptor expressie bestuderen van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in vergelijking met andere subtypen B lymfocyten. Indien deze regulatoire B lymfocyten inderdaad een beschermende functie lijken te hebben in artritis, zullen we bestuderen of deze immuun-regulerende B lymfocyten actief ziekte kunnen remmen. Hiervoor zullen we muizen met artritis behandelen met deze regulerende B lymfocyten als cellulaire therapie.

In het EAE model zijn de T lymfocyten de cellen die hoofdzakelijk de ziekte veroorzaken. In dit model zal bestudeerd worden of de APRIL-gemedieerde, regulatoire B lymfocyten deze T cellen kunnen remmen in hun functie of bescherming kunnen bieden tegen deze pathogene T cellen, waardoor de ernst van de ziekte verminderd of zelfs voorkomen wordt. -Indien dit het geval blijkt te zijn, zullen we bestuderen of de immuun-regulerende B lymfocyten actief ziekte kunnen remmen. Hiervoor zullen we muizen met EAE behandelen met deze regulerende B lymfocyten als cellulaire therapie.

Subdoel 3/ De immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.

Uit *in vitro* proeven op humane cellen is duidelijk geworden dat auto-antilichamen d.m.v. signalering via Fc receptoren voor sterke immuun activering zorgen van macrofagen en microglia, twee celtypen die een belangrijke rol spelen bij respectievelijk RA en MS. Ons vervolgonderzoek richt zich op dit moment op het identificeren van de onderliggende moleculaire mechanismen van de ontstekingsreacties door activering van Fc receptoren. Het identificeren van de onderliggende signaleringsmoleculen geeft ons de mogelijkheid om deze specifiek te remmen d.m.v. zogenaamde small molecule inhibitors, die steeds vaker gebruikt worden als therapeutische behandeling van zowel RA als inflammatoire darmziekten (IBD) (bv tofacitinib en baricitinib – beide JAK remmers). De vraag of immuun activatie van macrofagen en microglia d.m.v signalering via Fc receptoren een rol speelt tijdens de pathogenese van auto-immuunziekten zal beantwoord worden met de hier beschreven diermodellen voor RA en MS. Het CIA model wordt gebruikt om de rol van de antilichamen die geproduceerd worden door B lymfocyten op de activatie van macrofagen te onderzoeken. Ook wordt onderzocht in welke mate deze macrofaag activatie belangrijk is voor de ernst van de ziekte. In het CAIA model worden antilichamen ingespoten, in dit model is de antilichaam producerende rol van B lymfocyten niet nodig voor ziekte inductie. Dit model maakt het mogelijk om het directe effect van antilichamen op macrofaag activatie en de ontwikkeling van de ziekte te onderzoeken, zonder activatie van de B lymfocyten. Het EAE model wordt gebruikt, omdat uit eerder onderzoek is gebleken dat ook microglia (aanwezig in de hersenen) geactiveerd raken door Fc receptor signalering via (auto-)antilichamen. In hoeverre dit bijdraagt aan het ontstaan of de ernst van de ziekte wordt getest in het EAE model. Ook zullen we onderzoeken of JAK inhibitie de activatie van Fc receptoren in auto-immuunziekten daadwerkelijk kan blokkeren en of dit leidt tot verminderde ziekte in de artritis en MS modellen.

gebruikte type(n) dierproef of dierproeven.

Voor de verschillende deelprojecten zullen de volgende dierproeven worden gebruikt:

Subdoel 1/ De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van Bob1 overexpressie/blokkade op B lymfocyt differentiatie en antigeen presentatie.

De effecten van Bob1 overexpressie op B en T lymfocyt ontwikkeling en functies zal allereerst worden onderzocht in *ex vivo* experimenten.

Omdat de effecten van Bob1 overexpressie op B lymfocyt ontwikkeling *in vivo* nog niet bekend zijn en het ook niet bekend is of deze overexpressie kan leiden tot spontane (auto-immun)ziekte, zal tegelijkertijd het mogelijke ontstaan van spontane systemische auto-immuniteit in kaart worden gebracht gedurende 6 maanden. Mochten de Bob1 overexpressie muizen niet binnen de eerste drie maanden spontaan ziekteverschijnselen vertonen, dan wordt er gestart met CIA en EAE experimenten om auto-immuniteit te induceren en de effecten van Bob1 overexpressie hierop te bepalen. Het CAIA model zal worden gebruikt om de rol van Bob1 te onderzoeken in een model waar antilichaamproductie door B lymfocyten niet belangrijk is voor ziekte inductie.

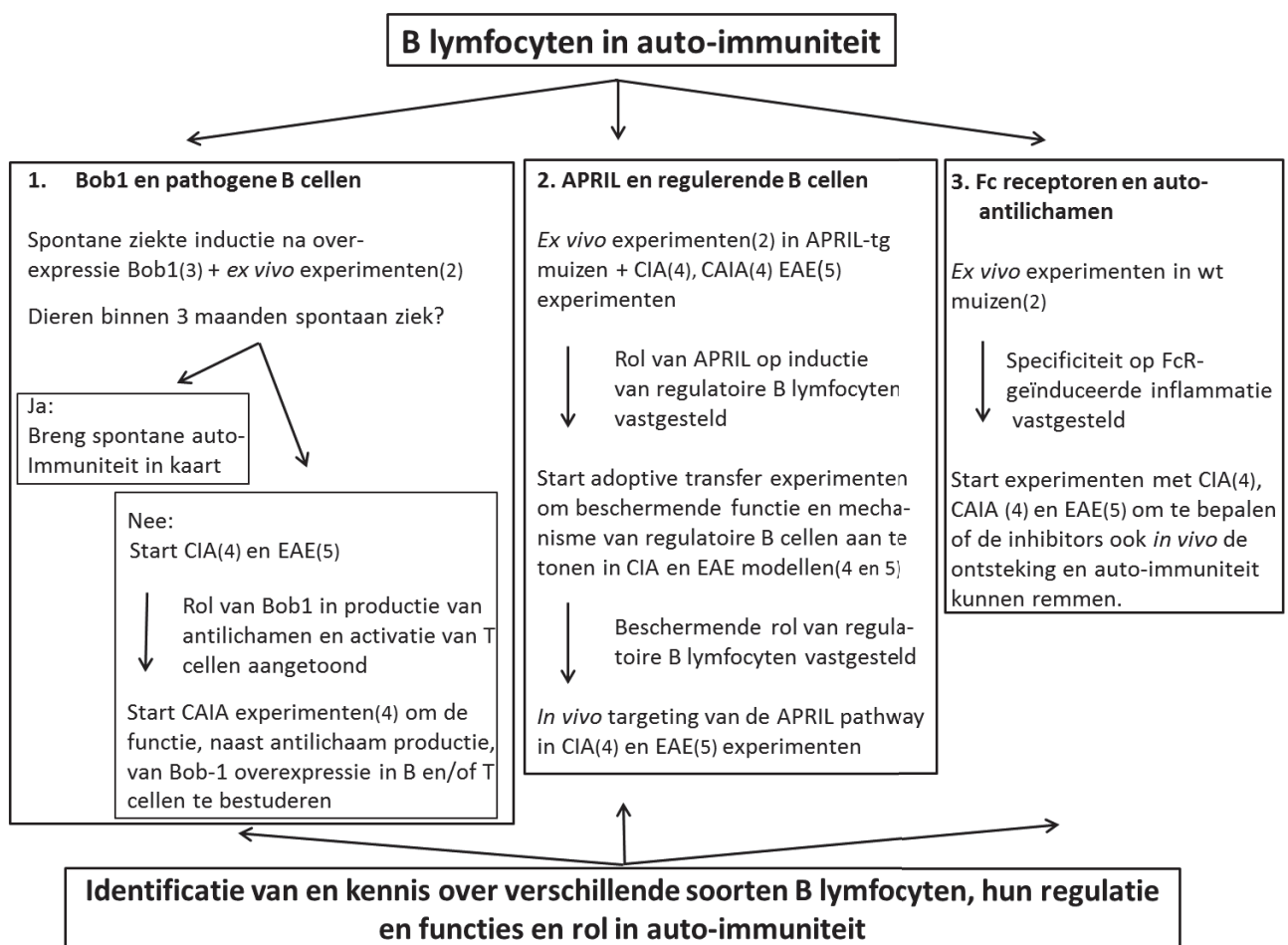
Subdoel 2/ De rol van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggend mechanisme in deze specifieke B lymfocyten.

Eerst zal gestart worden met *ex vivo* experimenten met materiaal van wild-type en APRIL-transgene muizen om de effecten van verhoogde APRIL expressie te bepalen op de ontwikkeling en functies van verschillende (regulatoire) B lymfocyt subsets. Ook zullen compounds *ex vivo* worden getest die ingrijpen op de APRIL signalering. Om aan te tonen dat de regulatoire B lymfocyten die geïnduceerd zijn door APRIL een beschermende functie hebben in auto-immuniteit, zullen CIA, CAIA en EAE experimenten worden gebruikt.

Preliminair data hebben aangetoond dat vooral de capaciteit van de APRIL-geïnduceerde B lymfocyten om IL-10 te produceren belangrijk is voor de beschermende effecten in CIA en EAE. Om aan te tonen dat inderdaad de IL-10 productie specifiek door deze B cellen cruciaal is om te beschermen tegen auto-immuniteit, zullen adoptieve transfer experimenten worden ingezet met IL-10 deficiënte B lymfocyten. Om het therapeutische potentieel van APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten te onderzoeken, zullen deze B lymfocyten worden ingespoten als cellulaire therapie in al zieke muizen (CIA en EAE model). Deze experimenten zijn nodig om aan te tonen dat APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten kunnen dienen als mogelijke cellulair therapie in muizen waarin een auto-immuniteit zich al gemanifesteerd heeft. Mocht uit deze experimenten naar voren komen dat regulatoire B lymfocyten beschermen tegen auto-immuniteit, dan zal een selectie van de *ex vivo* geteste compounds *in vivo* worden gebruikt in CIA en EAE modellen om te bestuderen of targeting van de APRIL pathway *in vivo* kan leiden tot inductie van regulatoire B lymfocyten en een verminderd ziektebeeld.

Subdoel 3/ De immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.

Verschiedende inhibitors van Fc receptor signalering zullen *ex vivo* getest worden op muizen cellen. Als uit deze experimenten blijkt dat er geen toxiciteit maar wel specificiteit is (i.e. alleen Fc receptor gemedieerde inflammatie worden geremd, maar niet effecten veroorzaakt door andere receptoren), zal met een selectie van de inhibitors *in vivo* worden getest of deze inhibitors van de specifieke Fc receptoren of hun downstream targets een remmende functie hebben op het ziekteverloop in CIA/CAIA en EAE (in reeds zieke muizen). Aangezien onze data uitwijzen dat de Fc receptor signalering verschilt tussen macrofagen en microglia zullen er andere inhibitors gebruikt worden voor beide ziektemodellen. Deze experimenten zijn bedoeld om te bepalen of remming van Fc receptor signalering gebruikt kan worden als therapie voor RA en/of MS.



Figuur 1. Een schematische samenvatting van het gebruikte type dierproeven per subdoel is weergegeven. De cijfers achter de verschillende type dierproeven verwijzen naar het bijlagennummer van het desbetreffende type experiment. Voor subdoel 1 verwachten we maximaal 1080 muizen te gebruiken, voor subdoel 2 zijn dit maximaal 1288 muizen en voor subdoel 3 maximaal 1110 muizen. Het totaal aantal muizen in deze aanvraag bedraagt maximaal 3478 muizen.

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

Het project, met als doelstelling het bestuderen van B lymfocyten en auto-antilichamen en hun rol in auto-immuunziekten, is opgedeeld in drie subdoelen:

1. De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van Bob1 overexpressie/deficiëntie op B lymfocyt differentiatie en functies.
2. De rol van APRIL-gemedieerde IL-10 producerende B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggende mechanismen in deze specifieke B lymfocyten.
3. De remming van immuun activering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.

Deze subdoelen hebben gemeenschappelijk dat ze alle drie de rol van B cellen in auto-immuniteit bestuderen, maar de focus van de subdoelen ligt op verschillende moleculaire signaalsystemen en B cel functies, zoals (pathogene) B lymfocyt regulatie door Bob1 in het eerste subdoel en (beschermende) B lymfocyt regulatie door APRIL in het tweede subdoel. De uitvoering van de experimenten binnen elk subdoel kunnen onafhankelijk van de overige subdoelen worden uitgevoerd.

Binnen elk subdoel is enige fasering van toepassing, wat ook zichtbaar is gemaakt in figuur 1. Voor subdoel 1 geldt dat wordt begonnen met het in kaart brengen van de spontane ziekte inductie gedurende

6 maanden bij overexpressie van Bob1 en *ex vivo* experimenten. Zijn de dieren niet ziek geworden binnen 3 maanden, dan pas wordt gestart met CIA en EAE experimenten om de rol van Bob1 op B lymfocyt differentiatie en functies in auto-immuniteit in kaart te brengen. Blijkt dat de dieren wel spontaan ziek worden, gaan we niet door met het induceren van ziekten, maar dan zullen we de spontane ziekteverschijnselen in kaart brengen en uitvoerig bestuderen, zowel *ex vivo* als *in vivo*. Omdat we verhoogde Bob1 expressie gevonden hebben in het synovium van reumatoïde artritis patiënten, zijn we in eerste instantie geïnteresseerd in de rol van Bob1 in het CIA model. We hebben bij een andere auto-immuunziekte, namelijk het syndroom van Sjögren, ook verhoogde Bob1 expressie waargenomen. Daarom denken we dat Bob1 niet alleen een rol speelt in reumatoïde artritis, maar in auto-antilichaam gemedieerde auto-immuunziekten in het algemeen. Dit willen we verifiëren in het EAE model. Om vervolgens te bepalen in welke fase van auto-immuunziekte Bob1 een rol speelt, vergelijken we de effecten van Bob1 overexpressie in het CIA of EAE model, waarin de inductie van de ziekte van belang is, met het CAIA model waarin de onderhoudsfase van de ziekte naar voren komt. Afhankelijk van de resultaten van de CIA en EAE experimenten wordt besloten of de CAIA experimenten noodzakelijk zijn.

Voor het tweede subdoel geldt dat wordt begonnen met *ex vivo* experimenten en *in vivo* experimenten waarin gebruik wordt gemaakt van APRIL-transgene muizen en CIA, CAIA en EAE modellen. EAE en CIA zijn beiden modellen voor auto-immuniteit in de muis, maar zijn verschillend in celtypes die een belangrijke rol spelen bij de inductie van de ziekte: in EAE spelen T en B lymfocyten een belangrijke rol, in CIA is vooral de antilichaam productie van de B lymfocyten belangrijk. Om een compleet beeld van de effecten van APRIL op auto-immuniteit te krijgen, zullen beiden modellen gebruikt worden. Deze experimenten zullen leiden tot kennis over de rol van APRIL in de inductie van regulatoire B lymfocyten en hun mogelijke bescherming tegen auto-immuniteit. CAIA experimenten zullen plaatsvinden om de functie van APRIL op B lymfocyten los van antilichaam productie te onderzoeken. Pas als een beschermende functie van APRIL is vastgesteld, zal gestart worden met adoptieve transfer experimenten waarin de APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten als cellulaire therapie worden ingezet in muizen met CIA en EAE. Mochten deze experimenten succesvol zijn en een beschermende rol van APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit aantonen, dan zal er gestart worden met *in vivo* experimenten waarin de APRIL pathway getarget zal worden met antilichamen/small molecule inhibitors in muizen met CIA en EAE. Dit soort interventies kan mogelijk bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën toepasbaar op patiënten met RA en MS.

Ook in het derde subdoel zal gestart worden met *ex vivo* experimenten om de specificiteit van Fc receptor-geïnduceerde ontsteking vast te stellen. Ook zal de effectiviteit van remming van deze Fc receptor activering op ontsteking worden vastgesteld. Bij positieve resultaten zal gestart worden met *in vivo* CIA, CAIA en EAE experimenten om de effectiviteit van deze remming van Fc receptor-geïnduceerde ontsteking door small molecule inhibitors vast te stellen. De artritis modellen zijn nodig om de rol van macrofagen en Fc receptor-gemedieerde ontsteking door (auto-)antilichamen tijdens de inductie fase (CIA) en tijdens de onderhoudsfase (CAIA) van de ziekte in kaart te brengen. Het CAIA model wordt ook gebruikt om vast te kunnen stellen in hoeverre de effecten waargenomen met het CIA model afhankelijk zijn van antilichaam productie door de B lymfocyten. Het EAE model is nodig om de rol van microglia en Fc receptor-gemedieerde ontstekingen in de hersenen te onderzoeken. Interventie van ontstekingsreacties door Fc receptor activering kan mogelijk bijdragen tot de ontwikkeling van nieuwe therapieën toepasbaar op patiënten met RA en MS.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Fok met mogelijk ongerief
2	<i>Ex vivo</i> experimenten
3	Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling
4	Artritis modellen CIA en CAIA

5	Experimentele autoimmuun encephalomyelitis (EAE)
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum - Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Fok met mogelijk ongerief

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Voor een aantal experimenten, horende bij deze CCD aanvraag, moeten we gebruik maken van dieren met een nog niet beschreven genotype. Van deze dieren is onbekend of zij ongerief ontwikkelen tijdens de fok.

Regulatoire B lymfocyten worden voornamelijk gekenmerkt door hun capaciteit om IL-10 te produceren. In voorgaande experimenten in ons laboratorium hebben we aangetoond dat APRIL transgene muizen gedeeltelijk beschermd zijn tegen auto-immuniteit, gemeten in CIA en EAE protocollen. Ook vonden wij een verhoogd aantal CD5⁺ IL-10-producerende B lymfocyten in het peritoneum van de APRIL transgene muizen vergeleken met de controle muizen. Om aan te tonen dat uitsluitend de IL-10 geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde B lymfocyten een rol speelt in de bescherming tegen CIA en EAE, gaan we gebruik maken van transfer experimenten met B lymfocyten uit IL-10 deficiënte muizen. De ontvanger muis is deficiënt in B lymfocyten en zal gekruist worden de APRIL-transgene muizen.

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

De B cel deficiënte muizen worden in fok genomen om gekruist te kunnen worden met APRIL transgene muizen. De APRIL tg (+/wt) x B cel knockout (-/-) en APRIL wt (wt/wt) x B cel knockout dieren die uit deze kruising ontstaan worden gebruikt als ontvanger muizen van IL-10 deficiënte B lymfocyten. Een gedetailleerde opzet van deze experimenten is beschreven in bijlagen 4 en 5. De ouderparen worden niet gebruikt in experimenten anders dan de fok.

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

Deze bijlage betreft een fok, dus als onderhoudsfok worden standaard 2 fokkoppels aangehouden in een continue fok om de dieren te behouden.

B. De dieren

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

B-cel deficiënte C57BL/6 muizen worden aangeschaft bij een commercieel bedrijf en vervolgens gekruist met de APRIL-transgene muizen uit eigen fok. Deze muizen worden als ontvanger muizen gebruikt voor de IL-10 deficiënte B celen. Van deze muizen moet worden vastgesteld of er sprake is van fok met ongerief door deze twee generaties te volgen. Hiervoor zijn 7 mannen en 7 vrouwen nodig. Dus **14** dieren in totaal. Een gedetailleerd schema van de kruisingen is hieronder weergegeven:

Kruising 1: $[APRIL^{+/wt} B\text{-}cel^{+/+}] \times [APRIL^{wt/wt} B\text{-}cel^{-/-}]$: start met 4 muizen (2 fokparen)

Nakomelingen: 1. $APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{+/-}$ (50%) - fokoverschot
2. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{+/-}$ (50%)

De nakomelingen met het $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{+/-}$ genotype (50% van de nakomelingen) worden gebruikt om de muizen met het juiste genotype te verkrijgen en gekruist met de ouder $[APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}]$ (voor het sneller verkrijgen van het juiste genotype en reductie van fokoverschot):

Kruising 2: $[APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{+/-}] \times [APRIL^{wt/wt} B\text{-}cel^{-/-}]$

Nakomelingen: 1. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{+/-}$ (25%) - fokoverschot
2. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$ (25%)
3. $APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{+/-}$ (25%) - fokoverschot
4. $APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$ (25%)

50% van deze nakomelingen heeft het juiste genotype (2. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$ en 4. $APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$).

Kruising 3: $[APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}] \times [APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}]$

Nakomelingen: 1. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$
2. $APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$

Alle nakomelingen uit kruising 3 kunnen gebruikt worden in CIA en EAE experimenten zoals beschreven in bijlage 4 en 5, omdat de $APRIL^{wt/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$ dienen als controle dieren voor de dieren met het genotype van interesse (1. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$). Deze methode zal zorgen voor vermindering van het fokoverschot.

- ➔ 50% van de nakomelingen uit kruising 3 heeft het juiste, onbekende genotype (1. $APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}$). Van deze dieren is niet bekend of zij spontaan ongerief ontwikkelen vanwege hun genotype en zullen daarom voor 2 generaties gecheckt worden op het ontstaan van onvoorzien ongerief. Hier worden 7 mannelijke dieren en 7 vrouwelijke dieren voor gebruikt.

We verwachten ongeveer 70 muizen nodig te hebben om 14 dieren (7 man, 7 vrouw) met het juiste genotype te verkrijgen. Er is geen spontaan ongerief beschreven van de muizen met een ander genotype, daardoor deze dieren worden als fokoverschot zonder ongerief beschouwd.

Berekening:

Kruising 1

Fok: 2 mannen x 2 vrouwen = 4 muizen

1 nest per paar met +/-6 pups elk = 12 muizen

Kruising 2

2 fokpaartjes met 2 nakomelingen en 2 originele fokdieren

1 nest per paar met +/- 6 pups elk = 12 muizen

Kruising 3:

2 fokpaartjes met nakomelingen van kruising 2

Uit deze kruising moeten we 7 mannen en 7 vrouwen genereren met als genotype $APRIL^{+/WT} \times B\text{-}cel^{-/-}$. Per nest krijgen we 50% met het correcte genotype en 50% man cq. 50% vrouw. Indien er 6 pups per nest geboren worden, betekent dat dat er 3 dieren met het correcte genotype zijn. Om 14 dieren te verkrijgen, moeten er $14 / 3 = 5$ (4.7) nesten geboren worden en dus 30 dieren.

Bij elkaar op geteld hebben we dus voor deze test: 4 fokdieren + 12 muizen (kruising 1) + 12 muizen (kruising 2) + 30 muizen (kruising 3) = 58 muizen nodig. Echter is de berekening met 50% het correcte genotype en 6 pups per nest een schatting (kansberekening), daarom rekenen we dat we **maximaal 70 dieren** nodig hebben om 7 mannen en 7 vrouwen te genereren met het juiste genotype en te controleren op spontaan ongerief.

Indien er inderdaad sprake is van een fok met ongerief, schatten we dat 50% van de fok daadwerkelijk dieren zijn van het genotype met ongerief. We verwachten voor de experimenten beschreven in bijlage 4 en 5 ongeveer 150 ontvanger muizen van 8-10 weken oud nodig te hebben, wat neerkomt op ongeveer 75 dieren die mogelijk ongerief ondervinden van de fok.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☒ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De onderhoudsfok van de $[APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}] \times [APRIL^{WT/WT} \times B\text{-}cel^{-/-}]$ muizen wordt minimaal gehouden op 2 fokparen. Beide genotypen die ontstaan uit deze kruising kunnen worden gebruikt in experimenten beschreven in bijlage 4 en 5. In de experimenten worden zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt, waardoor er ook geen fokoverschot ontstaat. Deze experimenten zullen vroeg (binnen 2 jaar na toekenning van de vergunning) worden uitgevoerd. De fok van $[APRIL^{+/wt} \times B\text{-}cel^{-/-}]$ en specifieke B cel deficiënte muizen zal hierdoor niet plaatsvinden gedurende de hele vergunningsperiode.

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

1/ De dieren worden gehuisvest onder SPF-condities in IVC-kooien om de kans op ongerief zoveel mogelijk te beperken. Bovendien worden de dieren niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden.

2/ Idem bijlage 4 en 5: De dieren worden in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van compounds, in een DMII omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

waarom duplicatie noodzakelijk is.

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We voorzien geen welzijnsaantasting voor de [APRIL^{+/wt} x Bcel^{-/-}] muizen in fok.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

De dieren worden gehuisvest onder SPF condities in IVC-kooien en behandeld in biohazard kasten.

J. Humane eindpunten

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

☒ Nee > Ga verder met vraag K.
☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.
Welk percentage van de dieren loopt kans deze criteria te halen?
K. Classificatie van ongerief
Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.
Licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden
Worden de dieren als onderdeel van het experiment of na afloop van het experiment gedood?
☐ Nee
☒ Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.
[APRIL ^{+/wt} x B-cel ^{-/-}] en [APRIL ^{wt/wt} x B-cel ^{-/-}] fokparen worden na maximaal 8 maanden gedood om de kans op ongerief vanwege een toenemende leeftijd (ouderdom) zo laag mogelijk te houden.
De B cel deficiënte x APRIL transgene muizen die gebruikt worden in CIA, CAIA en EAE experimenten worden na de duur van het experiment gedood, zoals beschreven staat in bijlage 4 (CIA/CAIA) en 5 (EAE). Wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU toegepast?
☐ Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.
☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum - Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		2	Ex vivo experimenten

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De rol van B lymfocyten in auto-immuniteit, met name RA en MS, is nog niet volledig bekend. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de transcriptiefactor Bob1 en de B cel groeifactor APRIL sterk geassocieerd zijn met RA en effecten hebben op de ontwikkeling van artritis in muizen. De effecten van Bob1 en APRIL op verschillende soorten B lymfocyten en hun functioneren zal onderzocht worden door middel van *ex vivo* experimenten.

De belangrijkste uitkomstparameters voor deze studies zijn effecten van Bob1 en APRIL op:

1. De ontwikkeling van verschillende types B en T lymfocyten
2. Antilichaam productie door de B lymfocyten
3. Antigeen-presentatie van de B lymfocyten
4. De expressie van immuun-modulerende moleculen en de productie van cytokines door B lymfocyten.
5. T lymfocyt proliferatie en cytokine productie

Tevens spelen B lymfocyten een rol bij RA en waarschijnlijk ook bij MS door de productie van auto-antilichamen. Uit onderzoek van zowel ons als van andere groepen blijkt dat deze auto-antilichamen immuuncomplexen kunnen vormen die andere immuun cellen (zoals macrofagen) aanzetten tot een sterke ontstekingsreactie. Het effect van immuuncomplexen op verschillende relevante myeloïde cellen zal ook onderzocht worden door middel van *ex vivo* experimenten. De belangrijkste uitkomstparameters zijn:

1. Differentiatie van macrofagen/microglia.
2. De expressie van immuun-modulerende moleculen en de productie van cytokines door macrofagen/microglia.
3. Metabole veranderingen op cellulair niveau in macrofagen/microglia.

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

Transgene muizen en controle muizen zijn afkomstig van onze eigen fok, of worden aangekocht via commercieel gerenommeerde fokbedrijven. Voor de *ex vivo* experimenten zal, waar mogelijk, gebruik worden gemaakt van surplus dieren met het juiste genotype (veelal wild type C57BL/6). De muizen worden getermineerd, waarna specifieke organen en/of bloed worden geïsoleerd om experimenten mee te kunnen doen.

De volgende experimenten zullen worden uitgevoerd:

1. Experimenten met geïsoleerde organen (zoals onder andere bot, synovium, lymfeklieren, darm en huid, milt en lymfe knopen):
 - Cel analyse door middel van immunohistochemische kleuringen op coupes, flow cytometrie experimenten en ELISA om verschillende populaties T en B lymfocyten fenotypisch en functioneel te karakteriseren. Voor deze experimenten zullen transgene en wild type controle dieren worden gebruikt.
 - RNA isolatie van specifieke weefselstructuren en cellen om de gen expressie patronen van specifieke moleculen van interesse te detecteren door middel van PCR, qPCR, RNA sequencing of microarray analyse.
2. Experimenten met geïsoleerde cellen:
 - Geïsoleerde cellen uit organen waarin we geïnteresseerd zijn (bijvoorbeeld de milt, beenmerg, lymfeklieren en synovium) worden *in vitro* gekweekt en geanalyseerd met verschillende laboratorium technieken (waaronder FACS, ELISA, cytopins en immunofluorescentie) om het fenotype en de functie te bepalen.

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

Doordat er veel verschillende organen en cellen uit één dier geïsoleerd kunnen worden voor meerdere experimenten, wordt het aantal benodigde dieren sterk beperkt. Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groepsgrootte worden berekend, waarbij het significantieniveau alpha steeds op 0.05 zal worden gesteld. Afhankelijk van de proefopzet zal gebruik worden gemaakt van de Student's T test, de Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA om de groepsgrootte te bepalen. Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de gekozen interventie en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt.

Er wordt gewerkt met wild type muizen dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-cel deficiënte dieren dan wel Fc receptor deficiënte dieren en humane Fc receptor transgene dieren).

Herkomst van de muizen is aankoop bij een gerenommeerd commercieel fokbedrijf of via eigen fok.

De specifieke Bob1 en APRIL transgene muizen zullen uit eigen fok komen, omdat deze niet commercieel verkrijgbaar zijn. Voor de overige muizen gaat onze voorkeur uit naar gebruik van muizen uit commerciële fokbedrijven.

Levensstadium: 6 tot 14 weken oud.

Geschatte aantallen:

Uit eerdere studies is gebleken dat de meeste vragen beantwoord kunnen worden als 6 muizen per groep gebruikt worden.

Gebaseerd op de overweging dat er 6 experimenten per subdoel per jaar worden ingezet, waarin transgene dieren worden vergeleken met wild-type dieren (2 groepen) per experiment zijn er voor dit type dierproef 6×5 (jaren, duur van de aanvraag) $\times 2$ (groepen) $\times 6$ (aantal dieren per groep) = 360 dieren per subdoel nodig.

Onze onderzoeksvraag is opgesplitst in 3 subdoelen, dus in totaal zullen er **maximaal $3 \times 360 = 1080$ dieren** nodig zijn voor dit type dierproef.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

|

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

☒ Nee

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

|

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Door het uitvoeren van *ex vivo* experimenten wordt veel informatie verkregen over de regulatie en functie van B cellen oiv Bob1, APRIL en FcR signalering met een relatief klein aantal dieren per experiment, doordat meerdere experimenten (ELISA, flow cytometry en RNA isolatie van gen expressie analyse) ingezet kunnen worden met materiaal afkomstig van één muis. Alle experimenten worden ingezet met het laagst mogelijke aantal dieren om de nul hypothese (geen verschil in groepsgemiddelde tussen de experimentele groep en de controle groep, met een power van 0.8 en alpha 0.05) te kunnen verwerpen.

Gebruik van dieren van commerciële fokbedrijven geeft minder fokoverschot vanwege meer gezamenlijk gebruik met andere onderzoeksinstituten. De specifieke Bob1 en APRIL transgene muizen zullen uit eigen fok komen, omdat deze niet commercieel verkrijgbaar zijn.

Door de kennis opgedaan met *ex vivo* experimenten kunnen de vraagstellingen voor de *in vivo* experimenten nauwkeuriger worden gesteld, wat leidt tot een vermindering van het aantal benodigde dieren voor de *in vivo* experimenten. Dit is bijvoorbeeld het geval in bijlage 4 en 5, waar we onder andere compounds die APRIL signalering induceren willen testen. Mocht uit de *ex vivo* experimenten naar voren komen dat een bepaalde compound geen gewenst effect heeft, dan zal deze compound niet *in vivo* worden getest in CIA en EAE modellen.

Tevens zijn *ex vivo* experimenten verfijnd, omdat er sprake is van minimaal ongerief voor de muizen (enkel terminale anesthesie) en wordt materiaal geïsoleerd uit één muis zo efficiënt mogelijk gebruikt, bijvoorbeeld door meerdere genen of eiwitten te analyseren uit één sample en meerdere type experimenten in te zetten.

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

De kans op pijn, lijden of angst wordt beperkt door de dieren enkel terminaal te anestheseren.

Idem bijlage 1 en 3: De dieren zullen in een gesloten D1 omgeving gehuisvest worden. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI- of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☒ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☐ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen experimenten uitgevoerd tijdens het leven van deze dieren, waardoor we geen aantasting in het welzijn van de dieren voorzien. Eventuele stress vanwege de huisvesting zal worden tegengegaan door te voorzien in kooiverrijking (tissues en huisjes) om bescherming te bieden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

N.v.t.

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

Eventuele stress vanwege de huisvesting zal worden tegengegaan door te voorzien in kooiverrijking (tissues en huisjes) om bescherming te bieden.

J. Humane eindpunten

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

☒ Nee > Ga verder met vraag K.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Het cumulatieve ongerief wordt ingeschaald als terminaal voor alle dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Verschillende organen en cellen worden geïsoleerd van de dieren om te gebruiken in *ex vivo* experimenten.

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum - Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Doel van de proef:

Er zijn in dit experiment drie doelen:

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen
2. Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening.
3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies.

Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters:

1 Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:

Om de Bob1 overexpressie aan te zetten zal toediening van tamoxifen oraal of via intra peritoneale injectie plaatsvinden. Verschillende toedieningsschema's en doseringen worden getest door op verschillende tijden bloed van de dieren af te nemen (max 10 ml/kg per keer, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen. Een groep wordt na 1 maand behandeling opgeofferd, en de andere groep na 2 maanden behandeling om de mate van Bob1 overexpressie in de organen te kunnen bepalen. Het toedieningsschema kan dan aangepast worden aan de mate van overexpressie.

2 Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening:

Voor dit subdoel kijken we naar het ziekteverloop in het gehele organisme. De muizen worden na start van de doorlopende behandeling met tamoxifen maximaal 6 maanden gevolgd om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen. De constante behandeling met tamoxifen is essentieel om de mate van Bob1 overexpressie in de B en T cellen in stand te houden tijdens de vernieuwing van cellen die vanuit het beenmerg plaatsvindt. Gedurende de studie wordt er bloed afgenomen om

te bepalen of Bob1 tot overexpressie komt. De primaire uitkomstparameters zijn afhankelijk van het ziektebeeld dat de muizen ontwikkelen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, en uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding en activiteit). Indien er specifieke symptomen van autoimmuunziekten ontstaan, gaan wij deze scoren. In het geval van artritis, wordt gescoord volgens het CIA model: een score van 0-4 voor iedere poot en een maximumscore van 16 per muis. De scores zijn als volgt gedefinieerd: 0 – normaal, gezond; 1 – milde zwelling van één gewricht; 2 – 2 of meer gewrichten zijn gezwollen; 3 – de gehele poot is gezwollen; 4- het gewricht is vervormd, stijf en kan niet gebruikt worden. In het geval van colitis, wordt er gescoord op de consistentie van de uitwerpselen en de hoeveelheid bloed die daarbij aanwezig is. De uitwerpselen worden als volgt gescoord: normale uitwerpselen: 0; natte uitwerpselen: 1; zachte uitwerpselen: 2; waterige diarree: 3. De aanwezigheid van bloed wordt als volgt gescoord: geen bloed aanwezig: 0; bloederige uitwerpselen en/of bloed rond de anus: 1; ernstige bloedingen: 2. De scores voor uitwerpselen en bloed worden opgeteld om tot een eindscore te komen. In het geval van Psoriasis wordt de roodheid en schilferigheid van de huid gescoord.

Aan het einde van de proef worden de muizen opgeofferd om verschillende organen te bestuderen op mogelijke pathologie.

3 Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:

Voor dit subdoel willen we de functionele aspecten van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyten op moleculair niveau in kaart brengen door o.a. te onderzoeken wat de rol is van Bob1 in B cel receptor (BCR) signalering, de capaciteit van de B lymfocyten om het isotype van hun antilichamen te verwisselen, de capaciteit van antigeen presentatie door B lymfocyten, de mate van hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten kunnen verstrekken, het meten van cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten en of de differentiatie van B en T lymfocyten beïnvloed wordt door veranderde Bob1 expressie. Hiervoor worden muizen blootgesteld aan tamoxifen, en na inductie van overexpressie (zoals getest in doel 1), worden muizen opgeofferd om verdere *ex vivo* proeven uit te voeren.

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

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:

Tamoxifen wordt toegediend in variërende doseringen. Dit zal oraal of via opeenvolgende intra peritoneale injecties plaatsvinden, volgens de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Hiervoor wordt geen anesthesie gebruikt. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn.

Tijdens de studie wordt op verschillende tijdstippen bloed afgenomen (max volume 10 ml/kg eens per 2 weken, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen en de dosering aan te passen. Na 1 en 2 maanden behandeling worden de dieren getermineerd.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop *in vivo*:

In eerste instantie vindt de tamoxifen toediening via het voer plaats, maar dit kan later aangepast worden aan de hand van de mate van overexpressie waargenomen in doel 1. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn. De muizen worden na start van de behandeling gedurende maximaal 6 maanden gevolgd om spontane ziekteverschijnselen in kaart te brengen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding) en activiteit.

3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:

Om onderzoek te doen naar de functionele aspecten (zoals antigeen presentatie van B lymfocyten en BCR (B cel receptor) signalering) van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten, worden muizen korte tijd (maximaal 2 maanden) behandeld met tamoxifen om Bob1 overexpressie te initiëren, waarna ze opgeofferd worden voordat eventuele spontane ziekteontwikkeling optreedt.

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

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:

Gebaseerd op literatuur betreffende enkele Cre-ERT2 muislijnen (Boross Genesis 2009; Aghajani Genesis 2012), zijn 3 muizen per Cre-lijn voldoende om de effectiviteit van de Cre-Recombinase vast te stellen. We willen twee toedieningsschema's met elkaar vergelijken (oraal versus intra peritoneaal), wat neerkomt op 6 muizen. De bob1 overexpressie zal geanalyseerd worden na 1 maand en na 2 maanden. Dit komt neer op een totaal van 12 muizen per Cre lijn.

Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste Cre-lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop *in vivo*:

Er is nog geen kennis over de Bob1 overexpressie muislijn, dus het is onmogelijk een accurate inschatting te maken van het aantal dieren dat spontaan ziek zal worden in de 6 maanden dat ze gevolgd worden voor subdoel 2. Er wordt gebruik gemaakt van 12 dieren per groep, gebaseerd op een andere studie waar ook het spontane ziekteverloop in transgene muizen werd bestudeerd (Sardjono; Arthritis & Rheumatism 2005). 28% van de transgene muizen ontwikkelde spontaan artritis. Met een groepsgrootte van 12 dieren zullen 4 dieren spontaan ziek worden als we deze incidentie toepassen. Echter, in de studie van Sardjono et al is een heel ander transgeen bestudeerd, dus de resultaten zijn niet direct vergelijkbaar.

Afhankelijk van het ontstaan van spontane ziekte zullen we de muizen behandelen:

1. Geen spontaan ziektebeeld/een licht ziektebeeld na 3 maanden:
De muizen zullen gevolgd worden tot 6 maanden na toediening van tamoxifen om eventuele ziekteontwikkeling na de eerste 3 maanden waar te kunnen nemen. Omdat de muizen na 3 maanden geen of lichte ziekte vertonen, wordt artritis en EAE geïnduceerd in 6-8 weken oude muizen zoals beschreven in respectievelijk bijlage 4 en 5. Onder een licht ziektebeeld verstaan we symptomen waarvan we verwachten dat ze geen of nauwelijks invloed hebben op het behalen van de humane eindpunten beschreven voor de artritis en EAE modellen.
2. Ontwikkeling van een ernstig ziektebeeld binnen 3 maanden:
Het volgen van de dieren wordt stopgezet na 3 maanden, het is niet nodig om de muizen langer te volgen als onze onderzoeksvraag al beantwoord is na 3 maanden na tamoxifen toediening. Ook vindt er geen inductie van EAE en CIA plaats, omdat het niet mogelijk is om de rol van Bob1 op B en T lymfocyten en auto-immuniteit goed te bestuderen in al zieke dieren. Dit omdat het niet valt uit te sluiten dat de EAE en artritis modellen beïnvloed worden door de spontane ziekte, waardoor er geen conclusies over de rol van Bob1 in auto-immuniteit getrokken kunnen worden.

3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:

Voor subdoel 3 is het aantal dieren met n=6 per groep voldoende om B en T cel functies *ex vivo* te kunnen bestuderen. Dit is gebaseerd op onze eerder ervaringen met andere muislijnen waarin cellulaire functies bestudeerd zijn.

Na het afronden van de proeven van subdoel 1 en eventueel subdoel 2 zullen we meer kennis hebben over het patroon van overexpressie in dit model, wat ons in staat stelt om het aantal benodigde dieren nauwkeuriger te berekenen in volgende experimenten.

B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van de artritis (bijlage 4) en multiple sclerose model (bijlage 5) die gebruikt worden in navolging van deze dierproef. Er wordt gewerkt met wild type muizen, dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie van Bob1 in verschillende celtypes) uit eigen fok.

Voor dit model worden muizen van eigen fok gekruist met Cre-ERT2 lijnen van gerenommeerde fokbedrijven om het mogelijk te maken overexpressie van Bob1 in B en T lymfocyten te initiëren.

Levensstadium: 6 weken tot max 8 maanden oud. Beide geslachten zullen worden gebruikt.

Geschatte aantallen per doel:

1. Het bepalen van optimale tamoxifen toediening:

Dit moet voor iedere gebruikte Cre-lijn getest worden. Per diergroep zijn 12 dieren nodig, waarvan de helft na 1 maand opgeofferd wordt en de andere helft na twee maanden. Het betreft hier één tot twee B lymfocyt specifieke Cre muizen, en één tot twee T lymfocyt specifieke Cre muizen. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel.

Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere

lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop:

Per diergroep zijn 12 dieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel.

3. Het in kaart brengen van functionele aspecten van Bob1 overexpressie middels ex vivo experimenten:

Per diergroep zijn 6 experimentele en 6 controledieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. We willen de rol van Bob1 overexpressie in verschillende functionele aspecten van B en T lymfocyten onderzoeken:

- A. B cel receptor (BCR) signalering
- B. Isotype verandering van antilichamen in B lymfocyten
- C. Antigeen presentatie door B lymfocyten aan T lymfocyten
- D. Hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten verstrekken
- E. Cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten
- F. Differentiatie van B en T lymfocyten in verschillende kweekcondities.

Voor elk doel binnen subdoel 3 gebruiken we 12 dieren per Cre muislijn, inclusief controledieren. In doelen A en B kijken we alleen naar de effecten van Bob1 overexpressie op B cellen, hiervoor gebruiken we beide B cel Cre lijnen. Dit komt neer op $2 \times 12 = 24$ muizen. Omdat het om 2 doelen gaat (A-B), hebben we $2 \times 24 = 48$ muizen nodig.

In doelen C-F willen we zowel B als T lymfocyten bestuderen. Hiervoor gebruiken alle 4 de Cre muislijnen. Dit komt neer op $4 \times 12 = 48$ muizen. We hebben 4 verschillende doelen die we willen bestuderen (C-F), dus zijn er $4 \times 48 = 192$ muizen nodig.

In totaal hebben we **$48 + 192 = 240$ muizen** nodig voor subdoel 3.

Het totaal aantal dieren voor deze bijlage bedraagt maximaal $2 \times 96 + 240 = 432$ muizen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is in dit geval niet mogelijk. Om het ontstaan van systemische auto-immuunziekten te onderzoeken is het organisme in zijn geheel nodig omdat buiten B en T lymfocyten nog andere cellen en weefsels een rol spelen bij het ontstaan van ziekte. Er zijn geen ex vivo systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flowcytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Zo wordt het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk teruggebracht. Daarnaast verminderen het aantal benodigde dieren door het optimale toedieningsschema van Cre eerst te bepalen in 1 Cre-lijn (doel 1). Hierdoor kan het geoptimaliseerde schema getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere

lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

Verfijning wordt bewerkstelligd door de dieren goed in de gaten te houden om ongerief te beperken. Bij signalen van verzwakte dieren door ontwikkeling van spontane auto-immuunziekte en/of ziekteverschijnselen zal geweeft voer op de bodem van de kooi geplaatst worden. Wanneer nodig, volgens de humane eindpunten, wordt een dier vroegtijdig uit de proef gehaald.

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

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. Om ontwikkeling van spontane ziekte te kunnen monitoren zullen de dieren minimaal 1 keer per week gecontroleerd worden. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra gewichtsverlies wordt waargenomen, wordt gel voor vocht en geweeft voer aangeboden op de bodem van de kooi. Wanneer een afwijkende activiteit of uiterlijk wordt geconstateerd, zullen de muizen vaker gewogen en geïnspecteerd worden (max 3 keer per week) om het ziektebeeld beter in kaart te kunnen brengen, en veranderingen in het gewicht nauwkeuriger te kunnen observeren.

2/ Idem bijlage 2: De dieren worden in een gesloten D1 omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting / humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Anesthesie is niet nodig voor de inductie van dit model. We weten niet of dit model spontaan ziekte induceert en ongerief met zich mee brengt, daarom worden deze experimenten uitgevoerd.

Indien er toch ernstig ongerief optreedt zoals beschreven bij de humane eindpunten, worden de dieren uit de proef gehaald.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1/ Tamoxifen toediening oraal of intraperitoneaal.
- 2/ Bloedafname tijdens het experiment.
- 3/ Euthanasie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Alle beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn verbonden met het beschreven diermodel en kunnen dus niet voorkomen worden.

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

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra ziekte ontwikkelt wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Bij te ernstig ongerief wordt het dier uit de proef gehaald. Dit wordt bepaald aan de hand van de humane eindpunten vermeld bij punt J.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Aangezien er nog geen kennis is over het mogelijke ongerief in dit model en de specifieke symptomen die hierbij zullen horen, wordt gewichtsverlies gebruikt als teken van ontstaan van systemische auto-immuunziekten.

In de eerste week na orale tamoxifen toediening kan gewichtsverlies optreden.

Gewichtsverlies na deze eerste week wordt gebruikt als een signaal voor systemische ziekte. Een verlies van 15% in ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht, of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten.

Verder wordt er gelet op het uiterlijk en de activiteit van de dieren. Een openstaande vacht en verminderde of afwijkende activiteit worden genoteerd en zijn een indicatie om vaker te gaan wegen (max 3 keer per week) om veranderingen in het gewicht nauwkeuriger te kunnen bijhouden.

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

Deze muizen zijn nog niet eerder gebruikt, dus het is onbekend hoeveel van de muizen deze criteria zullen halen. In onze *ex vivo* experimenten hebben we aangetoond dat Bob1 belangrijk is voor het functioneren van germinal centers die belangrijk zijn in de adaptieve immuun respons. We verwachten dat deze dieren in een SPF omgeving weinig activatie van hun adaptieve immuunsysteem ondervinden en er daardoor geen

symptomen van spontane autoimmuunziekte waargenomen worden.

K. Classificatie van ongerief

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

Matig. Deze dieren zijn nog nooit bestudeerd, en we weten dus niet of Bob1 overexpressie leidt tot spontane ziekteverschijnselen, of wat de aard van deze symptomen zal zijn.

De dieren hebben in ieder geval matig ongerief vanwege de tamoxifen behandelingen. Omdat het adaptieve immuunsysteem in een SPF omgeving weinig activatie zal ondervinden, achten wij de kans op het ontstaan van spontane auto-immuniteit door Bob1 overexpressie klein. Echter moet er rekening gehouden worden met de kans dat deze dieren wel spontaan auto-immuunziekte ontwikkelen wat mogelijk kan leiden tot ernstig ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Voor doel 1 om te kunnen beoordelen of Cre recombinatie voldoende heeft plaatsgevonden en Bob1 overexpressie voldoende aanwezig is.

Voor doel 2 om pathologische/histologische analyse op de weefsels uit te voeren.

Voor doel 3 om cellen te verkrijgen voor functionele *ex vivo* analyses.

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

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

☒ Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum - Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		3	Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Doel van de proef:

Er zijn in dit experiment drie doelen:

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen
2. Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening.
3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies.

Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters:

- 1 Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:
Om de Bob1 overexpressie aan te zetten zal toediening van tamoxifen oraal of via intra peritoneale injectie plaatsvinden. Verschillende toedieningsschema's en doseringen worden getest door op verschillende tijden bloed van de dieren af te nemen (max 10ml/kg per keer, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen. Enkele dieren (max 12 per groep) worden na 1 of 2 maanden behandeling opgeofferd om de mate van Bob1 overexpressie in de organen te kunnen bepalen. Het toedieningsschema kan dan aangepast worden aan de mate van overexpressie.
- 2 Het volgen van de dieren gedurende een half jaar om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen na/tijdens tamoxifen toediening:
Voor dit subdoel kijken we naar het ziekteverloop in het gehele organisme. De muizen worden na start van de doorlopende behandeling met tamoxifen maximaal 6 maanden gevolgd om het spontane ziekteverloop in kaart te brengen. De constante behandeling met tamoxifen is essentieel om de mate van Bob1 overexpressie in de B en T cellen in stand te houden tijdens de vernieuwing van cellen die vanuit het beenmerg plaatsvindt. Gedurende de studie wordt er bloed afgenomen om

te bepalen of Bob1 tot overexpressie komt. De primaire uitkomstparameters zijn afhankelijk van het ziektebeeld dat de muizen ontwikkelen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, en uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding en activiteit). Indien er specifieke symptomen van autoimmuunziekten ontstaan, gaan wij deze scoren. In het geval van artritis, wordt gescoord volgens het CIA model: een score van 0-4 voor iedere poot en een maximumscore van 16 per muis. De scores zijn als volgt gedefinieerd: 0 – normaal, gezond; 1 – milde zwelling van één gewricht; 2 – 2 of meer gewrichten zijn gezwollen; 3 – de gehele poot is gezwollen; 4- het gewricht is vervormd, stijf en kan niet gebruikt worden. In het geval van colitis, wordt er gescoord op de vorm van de uitwerpselen en de hoeveelheid bloed die daarbij aanwezig is. De uitwerpselen worden als volgt gescoord: normale uitwerpselen: 0; natte uitwerpselen: 1; zachte uitwerpselen: 2; waterige diarree: 3. De aanwezigheid van bloed wordt als volgt gescoord: geen bloed aanwezig: 0; bloederige uitwerpselen en/of bloed rond de anus: 1; ernstige bloedingen: 2. De scores voor uitwerpselen en bloed worden opgeteld om tot een eindscore te komen. In het geval van Psoriasis wordt de roodheid en schilferigheid van de huid gescoord.

Aan het einde van de proef worden de muizen opgeofferd om verschillende organen te bestuderen op mogelijke pathologie.

- 3 Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:
Voor dit subdoel willen we de functionele aspecten van Bob1 overexpressie in B en T cellen op moleculair niveau in kaart brengen door o.a. te onderzoeken wat de rol is van Bob1 in B cel receptor (BCR) signalering, de capaciteit van de B lymfocyten om het isotype van hun antilichamen te verwisselen, de capaciteit van antigeen presentatie door de B lymfocyten, de mate van hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten kunnen verstrekken, het meten van cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten en of de differentiatie van B en T lymfocyten beïnvloed wordt door veranderde Bob1 expressie. Hiervoor worden muizen blootgesteld aan tamoxifen, en na inductie van overexpressie (zoals getest in doel 1), worden muizen opgeofferd om verdere *ex vivo* proeven uit te kunnen voeren.

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

1. Het bepalen van de meest optimale manier van toediening voor tamoxifen:

Tamoxifen wordt toegediend in variërende doseringen. Dit zal oraal of via opeenvolgende intra peritoneale injecties plaatsvinden, volgens de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Hiervoor wordt geen anesthesie gebruikt. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn.

Tijdens de studie wordt op verschillende tijdstippen bloed afgenomen (max volume 8ml/kg eens per 2 weken, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de efficiëntie van Cre-recombinatie en Bob1 overexpressie te bepalen en de dosering aan te passen. Na 1 en 2 maanden behandeling worden de dieren getermineerd.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop *in vivo*:

In eerste instantie vindt de tamoxifen toediening via het voer plaats, maar dit kan later aangepast worden aan de hand van de mate van overexpressie waargenomen in doel 1. De behandeling wordt gestart wanneer de muizen minstens 6 weken oud zijn. De muizen worden na start van de behandeling gedurende maximaal 6 maanden gevolgd om spontane ziekteverschijnselen in kaart te brengen. Standaard parameters die in de gaten gehouden worden tijdens de gehele studie zijn gewicht (als teken van systemische ziekte), diarree, uiterlijk (vacht, poten, ogen, houding) en activiteit.

3. Het in kaart brengen van de rol van Bob1 overexpressie in B en T lymfocyt functies *ex vivo*:

Om onderzoek te doen naar de functionele aspecten (zoals antigeen presentatie van B lymfocyten en BCR (B cel receptor) signalering) van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten, worden muizen korte tijd behandeld met tamoxifen om Bob1 overexpressie te initiëren, waarna ze opgeofferd worden voordat eventuele spontane ziekteontwikkeling optreedt.

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

Gebaseerd op literatuur betreffende enkele Cre-ERT2 muislijnen (Boross Genesis 2009; Aghajani Genesis 2012), zijn 12 muizen per Cre-lijn voldoende om de effectiviteit van de Cre-Recombinase vast te stellen over een periode van twee maanden voor subdoel 1. De helft van de dieren (6) wordt na 1 maand opgeofferd om Bob1 expressie *ex vivo* te controleren, de andere helft van de dieren (6) wordt na 2

maanden opgeofferd. We willen twee toedieningsschema's met elkaar vergelijken (oraal versus intra peritoneaal), wat uiteindelijk dus neerkomt op 3 dieren per groep. Uit eerdere studies is gebleken dat de vraag of Cre tot expressie komt beantwoord kan worden als 3 muizen per groep worden gebruikt (Boross Genesis 2009; Aghajani Genesis 2012). Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste Cre-lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

Er is nog geen kennis over de Bob1 overexpressie muislijn, dus het is onmogelijk een accurate inschatting te maken van het aantal dieren dat spontaan ziek zal worden in de 6 maanden dat ze gevolgd worden voor subdoel 2. Er wordt gebruik gemaakt van 12 dieren per groep, gebaseerd op een andere studie waar ook het spontane ziekteverloop in transgene muizen werd bestudeerd (Sardjono; Arthritis & Rheumatism 2005). 28% van de transgene muizen ontwikkelde spontaan artritis. Met een groepsgrootte van 12 dieren zullen 4 dieren spontaan ziek worden als we deze incidentie toepassen. Echter, in de studie van Sardjono et al is een heel ander transgeen bestudeerd, dus de resultaten zijn niet direct vergelijkbaar.

Afhankelijk van het ontstaan van spontane ziekte zullen we de muizen behandelen:

1. Geen spontaan ziektebeeld na 3 maanden:
De muizen zullen gevolgd worden tot 6 maanden na toediening van tamoxifen om eventuele ziekteontwikkeling na de eerste 3 maanden waar te kunnen nemen. Een deel van de muizen wordt gebruikt in de CIA en EAE modellen (respectievelijk bijlage 4 en 5) om de effecten van Bob1 op geïnduceerde auto-immuunziekten te bestuderen.
2. Ontwikkeling van een licht ziektebeeld na 3 maanden:
De muizen zullen gevolgd worden tot 6 maanden na toediening van tamoxifen en goed gecontroleerd op verergering van het spontane ziektebeeld. Een deel van de muizen wordt gebruikt in de CIA en EAE modellen (respectievelijk bijlage 4 en 5) om de effecten van Bob1 op geïnduceerde auto-immuunziekten te bestuderen.
3. Ontwikkeling van een ernstig ziektebeeld na 3 maanden:
Het volgen van de dieren wordt stopgezet na 3 maanden, het is niet nodig om de muizen langer te volgen als onze onderzoeksvraag al beantwoord is na 3 maanden na tamoxifen toediening. Ook vindt er geen inductie van EAE en CIA plaats, omdat we in het spontane model de effecten van Bob1 overexpressie op ontstekingen en auto-immuniteit kunnen bestuderen.

Voor subdoel 3 is het aantal dieren met n=6 per groep voldoende om B en T cel functies *ex vivo* te kunnen bestuderen. Dit is gebaseerd op onze eerder ervaringen met andere muislijnen waarin cellulaire functies bestudeerd zijn.

Na het afronden van de proeven van subdoel 1 en eventueel subdoel 2 zullen we meer kennis hebben over het patroon van overexpressie in dit model, wat ons in staat stelt om het aantal benodigde dieren nauwkeuriger te berekenen in volgende experimenten.

B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van de artritis (bijlage 4) en multiple sclerose model (bijlage 5) die gebruikt worden in navolging van deze dierproef. Er wordt gewerkt met wild type muizen, dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie van Bob1 in verschillende celtypes) uit eigen fok.

Voor dit model worden muizen van eigen fok gekruist met Cre-ERT2 lijnen van gerenommeerde fokbedrijven om het mogelijk te maken overexpressie van Bob1 in B en T cellen te initiëren.

Levensstadium: 6 weken tot max 8 maanden oud. Beide geslachten zullen worden gebruikt.

Geschatte aantallen per doel:

1. Het bepalen van optimale tamoxifen toediening:

Dit moet voor iedere gebruikte Cre-lijn getest worden. Per diergroep zijn 12 dieren nodig, waarvan de helft na 1 maand opgeofferd wordt en de andere helft na twee maanden. Het betreft hier één tot twee B lymfocyt specifieke Cre muizen, en één tot twee T lymfocyt specifieke Cre muizen. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel. Nadat het optimale toedieningsschema bepaald is voor de eerste lijn, zal dit schema eerst getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.

2. Het in kaart brengen van het spontane ziekteverloop:

Per diergroep zijn 12 dieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. Dit komt neer op **maximaal 96 dieren** voor dit doel.

3. Het in kaart brengen van functionele aspecten van Bob1 overexpressie middels *ex vivo* experimenten:

Per diergroep zijn 6 experimentele en 6 controledieren nodig. Het betreft hier één tot twee lijnen met B lymfocyt specifieke Cre expressie, en één tot twee lijnen met T lymfocyt specifieke Cre expressie. Deze worden ieder vergeleken met een groep controle dieren zonder Cre expressie. We willen de rol van Bob1 overexpressie in verschillende functionele aspecten van B en T lymfocyten onderzoeken:

- B cel receptor (BCR) signalering
- Isotype verandering in B lymfocyten
- Antigeen presentatie door B lymfocyten aan T lymfocyten
- Hulp die T lymfocyten aan B lymfocyten verstrekken
- Cytokines geproduceerd door B en T lymfocyten
- Differentiatie van B en T lymfocyten in verschillende kweekcondities

Voor elk doel gebruiken we 12 dieren per muislijn, inclusief controledieren. Dit komt neer op 48 dieren per vraagstelling waarin B en T lymfocyten van belang zijn (4) en 24 dieren voor de vraagstellingen over B lymfocyten (2). Dit komt neer op $48 * 4 + 24 * 2 =$ **maximaal 240 dieren** voor dit doel.

Het totaal aantal dieren voor deze bijlage bedraagt maximaal $2 * 96 + 240 =$ **432 muizen**.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging is in dit geval niet mogelijk. Om het ontstaan van systemische auto-immuunziekten te onderzoeken is het organisme in zijn geheel nodig omdat buiten B en T lymfocyten nog andere cellen en weefsels een rol spelen bij het ontstaan van ziekte. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flowcytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Zo wordt het aantal benodigde dieren zoveel mogelijk teruggebracht. **Daarnaast verminderen het aantal benodigde dieren door het optimale toedieningsschema van Cre eerst te bepalen in 1 Cre-lijn (doel 1). Hierdoor kan het geoptimaliseerde schema getest worden op een verminderd aantal dieren voor de andere lijnen. Indien dit schema ook goed werkt voor de andere lijnen, zullen niet de volledige 12 dieren per groep hiervoor nodig zijn.**

Verfijning wordt bewerkstelligd door de dieren goed in de gaten te houden om ongerief te beperken. Bij signalen van verzwakte dieren door ontwikkeling van spontane auto-immuunziekte en/of ziekteverschijnselen zal geweekt voer op de bodem van de kooi geplaatst worden. Wanneer nodig, volgens de humane eindpunten, wordt een dier vroegtijdig uit de proef gehaald.

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

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. Om ontwikkeling van spontane ziekte te kunnen monitoren zullen de dieren minimaal 1 keer per week gecontroleerd worden. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra ziekte ontwikkelt wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi.

2/ Idem bijlage 2: De dieren worden in een gesloten D1 omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Anesthesie is niet nodig voor de inductie van dit model. We weten niet of dit model spontaan ziekte induceert en ongerief met zich mee brengt, daarom worden deze experimenten uitgevoerd. Indien er toch ernstig ongerief optreedt zoals beschreven bij de humane eindpunten, worden de dieren uit de proef gehaald.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1/ Tamoxifen toediening oraal of intraperitoneaal.
- 2/ Bloedafname tijdens het experiment.
- 3/ Euthanasie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Alle beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn verbonden met het beschreven **diermodel** en kunnen dus niet voorkomen worden.

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

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden. Zodra ziekte ontwikkelt wordt gel voor vocht en geweeft voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Bij te ernstig ongerief wordt het dier uit de proef gehaald. Dit wordt bepaald aan de hand van de humane eindpunten vermeld bij punt J.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Aangezien er nog geen kennis is over het mogelijke ongerief in dit model en de specifieke symptomen die hierbij zullen horen, wordt gewichtsverlies gebruikt als teken van ontstaan van systemische auto-immuunziekten.

In de eerste week na orale tamoxifen toediening kan gewichtsverlies optreden.

Gewichtsverlies na deze eerste week wordt gebruikt als een signaal voor systemische ziekte. Een verlies van 15% in ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht), of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten.

Verder wordt er gelet op het uiterlijk en de activiteit van de dieren. Een opstaande vacht en verminderde of afwijkende activiteit worden genoteerd en indien dit aanhoudt (in combinatie met gewichtsverlies) worden de dieren uit de proef gehaald.

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

Deze muizen zijn nog niet eerder gebruikt, dus het is onbekend hoeveel van de muizen deze criteria zullen halen. In onze *in vitro* experimenten hebben we aangetoond dat Bob1 belangrijk is voor het functioneren van germinale centra die belangrijk zijn in de adaptieve immuunrespons. We verwachten dat deze dieren in een SPF omgeving weinig activatie van hun adaptieve immuunsysteem ondervinden en er daardoor geen symptomen van spontane autoimmuunziekte waargenomen worden.

K. Classificatie van ongerief

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

Matig. Deze dieren zijn nog nooit bestudeerd, en we weten dus niet of Bob1 overexpressie leidt tot spontane ziekteverschijnselen, of wat de aard van deze symptomen zal zijn.

We verwachten matig ongerief vanwege de tamoxifen behandelingen. Omdat het adaptieve immuunsysteem

in een SPF omgeving weinig activatie zal ondergaan, achten wij de kans op het ontstaan van spontane auto-immuniteit door Bob1 overexpressie klein. We verwachten geen symptomen en ongerief. Echter moet er rekening gehouden worden met de kans dat deze dieren wel spontaan auto-immuunziekte ontwikkelen wat kan leiden tot ernstig ongerief. Dit ongerief is niet acuut, maar is afkomstig van een opbouwende auto-immuunziekte. Met in achtneming van de humane eindpunten wordt in maximaal 5% van de dieren ernstig ongerief verwacht.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Voor doel 1 om te kunnen beoordelen of Cre recombinatie voldoende heeft plaatsgevonden en Bob1 overexpressie voldoende aanwezig is.

Voor doel 2 om pathologische/histologische analyse op de weefsels uit te voeren.

Voor doel 3 om cellen te verkrijgen voor functionele *ex vivo* analyses.

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

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

☒ Ja



Bijlage Beschrijving dierproeven

8

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academisch Medisch Centrum - Amsterdam	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		4	Artritis modellen (CIA en CAIA)

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Afhankelijk van onze vraagstellingen maken we gebruik van twee artritis modellen.

Het eerste model is collageen-geïnduceerde artritis (CIA). Dit is een veelvuldig beschreven model waarin muizen geïmmuniseerd worden met collageen om uiteindelijk artritis te ontwikkelen (Bevaart L. et al., Methods Mol Biol., 2010; 602:181-92). Het model is afhankelijk van B en T lymfocyten; muizen zonder T lymfocyten (Wooley et al., J. Exp. Med. 1981; 154:688) of B lymfocyten (Svensson et al., Clin. Exp. Immunol., 1998; 111:521) zijn volledig beschermd tegen de ontwikkeling van artritis.

Het CIA model zal gebruikt worden in verschillende muislijnen om vragen te beantwoorden met betrekking tot het functioneren van het immuunsysteem, met name B lymfocyten, in de inductie en onderhoudsfase van artritis.

Het tweede model is collageen-antilichaam geïnduceerde artritis (CAIA). Dit is een goed bestudeerd en beschreven model met een passieve transfer van een mix van collageen type II-specifieke antilichamen, dat leidt tot een snelle, uitgesproken artritis inductie in muizen (Nandakumar and Holmdahl, Journal of Immunol. Methods, 2005; 304:126-136).

Met het CAIA model als secundair model voor artritis kunnen we onderscheid maken in de rol die B lymfocyten spelen in de inductiefase (CIA) versus de onderhoudsfase (CAIA). In het CIA model wordt geïmmuniseerd, waarna de B lymfocyten anti-collageen antilichamen gaan produceren die gewrichtsontstekingen veroorzaken (inductiefase). In het CAIA model worden antilichamen tegen collageen ingespoten, waardoor het proces van antilichaam productie door B lymfocyten *in vivo* wordt overgeslagen.

Behandeling met antilichamen of small molecule inhibitors:

Er worden experimenten uitgevoerd waarin signaleringsmoleculen belangrijk in de inductie en/of activatie

van regulatoire B lymfocyten en de activering van Fc-receptor signalering worden getarget. Targeting van deze pathways via antilichamen of small molecule inhibitors gedurende CIA experimenten zal leiden tot kennis over de functies van regulatoire B lymfocyten en activatie van de Fc-receptor signalering in artritis en levert resultaten over de mogelijke klinische relevantie van interventies op deze signaleringsmoleculen voor RA patiënten.

CIA en CAIA experimenten na adoptieve transfer (bijvoorbeeld na transfer van IL-10 deficiënte B cellen): Het doel van dit type dierproef is om de bijdrage van bepaalde type T en/of B lymfocyten in de ontwikkeling van auto-immuunziekten, specifiek RA, te achterhalen door deze cellen systemisch in te spuiten in muizen met artritis. Daarnaast zullen adoptieve transfer experimenten worden gebruikt om het therapeutische potentieel van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen als cellulair vaccin tegen RA te testen in de daarvoor beschreven model.

De belangrijkste uitleesparameters in de adoptieve transfer experimenten zijn:

1. De klinische scores van de verschillende ziektemodellen. Na adoptieve transfer van relevante T en/of B lymfocyt subsets zal het verloop van de ziekte worden bestudeerd om de *in vivo* functie van deze specifieke cellen in auto-immuunziekten te achterhalen.
2. Dit model is ook geschikt om de effecten van de specifieke cellen gebruikt voor transfer op andere B en/of T lymfocyt subsets en hun functies te bestuderen.

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

Het CIA model:

Er is een protocol voor de efficiënte inductie van CIA in C57BL/6 muizen (Bevaart L. et al., Methods Mol Biol., 2010; 602;181-92), dat veelvuldig binnen onze afdeling gebruikt wordt.

In het kort:

C57BL/6 muizen worden twee maal geïmmuniseerd (100 µl per keer) met kippen collageen type II en Complete Freund's Adjuvant (CFA) (initiatie + booster), aangezien C57BL/6 muizen minder vatbaar zijn voor CIA ten opzichte van DBA/1 muizen. De tweede immunisatie vindt plaats 21 dagen na de eerste immunisatie. De immunisaties worden intradermaal uitgevoerd bij de staartbasis van de muis. Hiervoor moet de staartbasis eerst geschoren worden. De immunisaties vinden plaats onder anesthesie met isofluraan. Het wegen van de muizen en het bijhouden van artritis scores begint 18 dagen na de eerste immunisatie.

De dieren worden op zijn laatst 100 dagen na de eerste immunisatie gedood.

Het CAIA model:

De inductie van CAIA is uitgebreid beschreven in het protocol dat de fabrikant meelevert met de anti-collageen type II cocktail. We gebruiken dit geoptimaliseerde en gevalideerde protocol in onze experimenten.

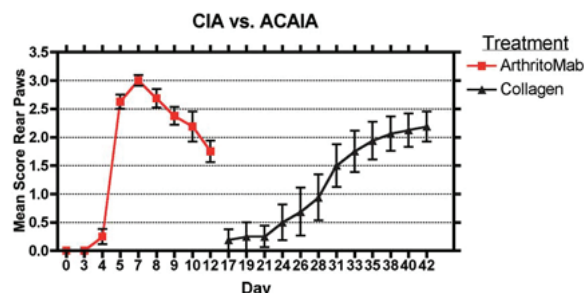
In het kort: op dag 0 worden muizen geïnjecteerd met de antilichaam cocktail en 3-5 dagen na deze immunisatie ontvangen de muizen een lage concentratie lipopolysaccharide (LPS) om de ziekte te synchroniseren tussen de muizen. Dit verergert het ziektebeeld niet. Artritis ontwikkelt vanaf dag 4 en de muizen worden 2 weken na ziekte inductie gevolgd. De piek van de ziekte ontstaat rond dag 8 na immunisatie, daarna neemt de ontsteking (zwelling van de poten) weer af.

In beide modellen:

Tijdens de studie kan op meerdere tijdstippen bloed afgenomen worden (max volume 10 ml/kg eens per 2 weken (Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001) om de vorming van anti-collageen antilichamen te onderzoeken in het CIA model, of o.a. cytokines en acute fase eiwitten te kunnen meten in beide modellen.

Voor het scoren wordt een gestandaardiseerd protocol gebruikt met een score van 0-4 per poot en een maximum van 16 per muis (4 poten met een maximale score). Score: 0 – gezond; 1 – milde zwelling (1 vinger/teen of gewricht); 2 – 2 of meer vingers/tenen of gewrichten; 3 – een totaal gezwollen poot; 4 – deformatie van de gehele poot.

In het CIA model wordt 2-3 keer per week gescoord vanaf 18 dagen na de eerste immunisatie. In het CAIA model worden de dieren dagelijks gescoord.



(<http://www.arthritomab.com>)

Figuur 1: Ziekteverloop van het CAIA model, geïnduceerd met ArthritoMab (rood), vergeleken met het CIA model, geïnduceerd met behulp van collageen (zwart). De zwelling van de poten neemt veel sneller toe in het CAIA model dan in het CIA model, en neemt ook weer snel af. Als gevolg zijn de dieren veel korter in het experiment.

Behandeling met antilichamen of small molecule inhibitors:

Voor subdoelen 2 en 3 uit het projectvoorstel worden muizen behandeld met stoffen die de APRIL pathway of Fc-receptor pathway activeren of blokkeren. Deze worden afhankelijk van de compound oraal, subcutaan, intraperitoneaal, of intraveneus toegediend met in acht neming van de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Bij herhaaldelijke injecties wordt rekening gehouden met mogelijke inflammatie op de plaats van injectie, en indien mogelijk wordt een andere locatie genomen voor opeenvolgende injecties. Ook zal het gebruik van osmotische pompjes in overweging worden genomen wanneer frequent en voor langere tijd geïnjecteerd gaat worden.

Adoptive transfer experimenten:

Afhankelijk van de specifieke onderzoeksvraag van het experiment, zullen B en/of T lymfocyt populaties worden verkregen van relevante (transgene of knock out) muizen. Deze cellen zullen vervolgens systemisch (subcutaan, in de peritoneale ruimte of intraveneus via de staartvene (Roth et al. *Journal of Experimental Biology*, 1997)) worden ingespoten in ontvanger muizen. Cel aantallen die ingespoten worden zijn afhankelijk van de B en/of T lymfocyt populaties die gebruikt worden.

De transfer van cellen vindt plaats naar ontvanger muizen voor aanvang van artritis (profylactische setting) en/of de dieren al artritis hebben ontwikkeld (therapeutische setting). Met de laatstgenoemde set experimenten kan worden onderzocht of bepaalde subsets van B en/of T lymfocyten gebruikt kunnen worden als cellulair vaccin tegen auto-immuunziektes. Inductie van CIA en CAIA vindt plaats zoals hierboven beschreven voor beide modellen.

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

Idem bijlage 5: Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groeps-grootte worden berekend, waarbij het significantieniveau α steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt

van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet, om deze groeps-grootte te bepalen.

Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de gekozen interventie en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

Voorbeeld van de standaard uitgevoerde analyse binnen onze groep:

We berekenen de groeps-grootte met behulp van het programma power and precision Pro (<http://www.power-analysis.com/>). We gebruiken de tweezijdige T test voor onafhankelijke samples, met een power van 80% en een P waarde van 0.05:

Type studie: T-test

Gewenste output: Groeps-grootte

Ontwerp: Onafhankelijk
Alfa=0,05 power=0,8 DIFF=6 SIGMA=5 M=1
Groepsgrootte: 12

We kijken in ons onderzoek naar een continue uitkomstparameter van onafhankelijke controle en experimentele dieren, met 1 controle dier per experimenteel dier. In vorige onderzoeken waren de uitkomstparameters normaal verdeeld met een standaarddeviatie van 5. Wanneer het werkelijke verschil tussen de gemiddeldes van de controle en experimentele groepen 6 is, zullen we zowel 12 dieren nodig hebben in de experimentele groep en in de controlegroep om de nul hypothese, dat de populatiegemiddeldes van de experimentele en controle groepen gelijk zijn, met een kans (power) van 0,8 te kunnen verwerpen. De fout van de eerste orde (alfa) die in deze toetsing van de nul hypothese wordt geaccepteerd is 0,05.

B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn goed gekarakteriseerd voor de verschillende uitleesparameters. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van beide arthritis modellen. Er wordt gewerkt met wild type muizen dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-cel deficiënte dieren; FcR deficiënte dieren dan wel humane FcR transgene dieren).

Herkomst van de muizen is aankoop bij een gerenommeerd fokbedrijf of via eigen fok.

Levensstadium: 6 weken tot maximaal 6 maanden oud. We gebruiken zowel mannen als vrouwen.

Geschatte aantallen per subdoel:

Subdoel 1: Bob1 en auto-immuniteit

We hebben 12 dieren per groep nodig. Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (tabel 1). Deze experimenten worden alleen uitgevoerd indien de Bob1 overexpressie muizen in het spontane ziektemodel (bijlage 3) binnen de eerste drie maanden van tamoxifen toediening geen zichtbaar ongerief of gewichtsverlies ontwikkelen.

Tabel 1.

	Immunisatie	Follow up	n
Controle CIA	Collageen type II/CFA	Max. 100 dagen	12
Transgeen CIA	Collageen type II/CFA	Max. 100 dagen	12
Controle CAIA	collageen type II antilichaam cocktail/ LPS	Max. 100 dagen	12
Transgeen CAIA	collageen type II antilichaam cocktail/ LPS	Max. 100 dagen	12

We hebben 2 modellen (CIA en CAIA), 4 transgene Cre-muislijnen en 4 controle groepen. Dit komt neer op $2 * 12 * 4 = 96$ benodigde muizen.

Subdoel 2: APRIL en auto-immuniteit

We hebben 12 dieren per groep nodig. Het eerste experiment zal plaatsvinden met 12 APRIL-transgene muizen en 12 controle dieren (zie tabel 1). Dit komt neer op $12 * 2 = 24$ dieren per arthritis model. In totaal dus $2 * 24 = 48$ dieren.

In het volgende experiment bekijken we de effecten van een behandeling met biologicals of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op de APRIL pathway in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Aangezien we veronderstellen dat de antilichaam productie door B lymfocyten een belangrijke bijdrage levert aan het ziektebeeld en dat de compounds hier een effect op hebben, voeren we dit type experiment alleen uit in het CIA model. Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (zie tabel 2):

Tabel 2.

	Inductie CIA	N
A controle	profylactisch	12
B behandeling compound	profylactisch	12
C controle	therapeutisch	12
D behandeling compound	therapeutisch	12

Per compound zijn in het profylactische model $2 \times 12 = 24$ muizen nodig. In het therapeutische model moeten alle dieren ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. Voor CIA verwachten we dat ongeveer 80% van de muizen ook daadwerkelijk ziek wordt, hiervoor moeten we dus compenseren in het therapeutische model. Dit komt neer op: $24 + 5$ (20% van 24) = 29 muizen. Gecombineerd met het profylactische model zijn dit $24 + 29 = 53$ muizen.

We verwachten maximaal 3 verschillende compounds (antilichamen of small molecule inhibitors die interfereren met de APRIL pathway) te testen en hebben dus $3 \times 53 = 159$ dieren nodig voor dit experiment.

Adoptieve transfer experimenten:

Uit eerdere studies is gebleken dat de meeste vragen beantwoord kunnen worden als 12 muizen per groep worden gebruikt. In het eerste experiment willen we aantonen dat de IL-10 specifiek geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde B cellen belangrijk is voor de bescherming tegen CIA en CAIA. Om dit aan te tonen plannen we een experiment met de volgende groepen en dieraantallen (zie tabel 3):

Tabel 3.

	Genotype ontvanger muis	Genotype donor muis	N
A	[APRIL ^{WT/WT} x B-cel ^{-/-}]	IL-10 ^{-/-} B lymfocyten	12
B	[APRIL ^{WT/WT} x B-cel ^{-/-}]	WT B lymfocyten	12
C	-[APRIL ^{+/-WT} x B-cel ^{-/-}]	IL-10 ^{-/-} B lymfocyten	12
D	-[APRIL ^{+/-WT} x B-cel ^{-/-}]	WT B lymfocyten	12

Dit experiment wordt gepland in modellen voor CIA en CAIA. Dit levert $2 \times 4 \times 12 = 96$ dieren. Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 40 miljoen B cellen uit een milt van 1 muis halen. De B cel deficiënte muizen zullen 10 miljoen B lymfocyten ontvangen. Met 1 milt kunnen dus 4 muizen behandeld worden. Er zijn 24 donormuizen per genotype nodig. $24/4 = 6 + 2$ extra (ter compensatie van mogelijk verlies van B cellen door het isoleren en opwerken) = 8 donormuizen/genotype. We hebben 2 genotypen voor de donormuizen, dus komen we op een totaal van $8 \times 2 = 16$ muizen. Met 2 ziektemodellen zullen dit dus $16 \times 2 = 32$ donor muizen zijn.

Voor dit type experiment hebben we maximaal $96 + 32 = 128$ muizen nodig.

In het volgende experiment willen we aantonen dat de transfer van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen werkt als celtherapie voor CIA. CAIA experimenten zijn hiervoor niet nodig, omdat het CIA model voldoende informatie zal geven over de mogelijke beschermende functie van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen. Hiervoor maken we gebruik van een proefopzet met de volgende groepen en dieraantallen:

	Genotype ontvanger muis	Genotype donor muis	Model	N
A	WT	WT regulatoire B-cellen	profylactisch	12
B	WT	APRIL ^{+/-WT} tg regulatoire B-cellen	profylactisch	12
C	WT	WT regulatoire B-cellen	therapeutisch	12
D	WT	APRIL ^{+/-WT} tg regulatoire B-cellen	therapeutisch	12

Alle ontvangermuizen in het therapeutische model moeten ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. Voor CIA verwachten we dat ongeveer 80% van de muizen ook daadwerkelijk ziek wordt, hiervoor moeten we dus compenseren in het therapeutische model. Dit komt neer op: $24 + 24 + 5$ (20% van 24) = 53 muizen. In totaal hebben we dus 53 ontvangermuizen nodig.

Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 3 miljoen B cellen uit het peritoneum van 1 muis halen. We willen 1 miljoen B cellen inspuiten in de ontvanger muis, dus $3/1 = 3$ muizen kunnen behandeld worden met B lymfocyten uit 1 donormuis. $24 \text{ muizen} / 3 = 8, + 2$ extra

(ter compensatie van mogelijk verlies van B cellen door het isoleren en opwerken) donormuizen per genotype nodig. We hebben 2 verschillende genotypen dus zijn er $2 \times 10 = 20$ donormuizen nodig.

Voor dit type experiment hebben we maximaal $53 + 20 = 73$ muizen nodig.

Het totaal aantal muizen voor adoptieve transfer experimenten in het CIA en/of CAIA model wordt geschat op maximaal **201** muizen.

In totaal zijn voor subdoel 2: $48 + 159 + 201 = 408$ muizen nodig.

Subdoel 3: Fc receptoren en auto-immuniteit

Om de rol van humane Fc receptor activatie op de ontwikkeling van CIA of CAIA te testen schatten we dat we 4 verschillende humane Fc receptor transgene muizen gaan gebruiken in een proefopzet zoals beschreven in tabel 1. Dit komt neer op $4 \times 12 \times 2 = 96$ dieren per model.

Vervolgens zullen we de effecten van een behandeling met antilichamen of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op activatie van de Fc receptor testen in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Hiervoor maken we gebruik van het schema in tabel 2. Per compound zijn in het profylactische model $2 \times 12 = 24$ muizen nodig. In het therapeutische model moeten alle dieren ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. Voor CIA en CAIA verwachten we dat ongeveer 80% van de muizen ook daadwerkelijk ziek wordt, hiervoor moeten we dus compenseren in het therapeutische model. Dit komt neer op: $24 + 5$ (20% van 24) = 29 muizen. Gecombineerd met het profylactische model zijn dit $24 + 29 = 53$ muizen.

We schatten 3 verschillende compounds (biologicals of small molecule inhibitors die interfereert met de Fc receptor signaling) te testen en hebben dus $3 \times 53 = 159$ dieren per model nodig.

In totaal zullen voor subdoel 3: $96 + 159 = 255$ muizen nodig zijn per arthritis model.

In totaal dus $2 \times 255 = 510$ dieren voor subdoel 3.

Het totaal aantal muizen dat wij nodig hebben voor deze bijlage is $192 + 408 + 510 = 1110$ muizen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

| |

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

☐ Nee

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

| |

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flow cytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Vermindering vindt ook plaats door bepaalde

experimenten (zoals bijvoorbeeld de transfer van APRIL-geïnduceerde regulatoire B cellen als celtherapie in subdoel 2) in 1 arthritis model te testen in plaats van in beide. Daarnaast vindt er vermindering van het aantal dieren plaats door de therapeutische experimenten waarin compounds getest worden (subdoel 2 en 3) alleen plaats te laten vinden als de data uit de profylactische experimenten met de compounds verschillen in ziekte laten zien.

Idem bijlage 5: Vermindering vindt ook plaats door experimenten te starten met 6 dieren per groep, ondanks dat de groepsgrootte statistisch is bepaald op 12. Mocht er geen verschil tussen de controle groep en de experimentele groep optreden bij gebruik van 6 muizen per groep, dan wordt het experiment niet voortgezet met de overige 6 muizen.

Verfijning wordt bewerkstelligd door de vraagstelling correct te formuleren en alleen het juiste ziektemodel te gebruiken, die de vraagstelling kan beantwoorden. Zodra ziekte ontwikkelt, wordt gel voor vocht en geweekt voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Voor de behandeling met compounds in subdoel 2 en 3 zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken om herhaaldelijk injecteren over een langere periode te voorkomen.

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

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en geweekt voer wordt toegevoegd tijdens de piek van de ziekte. In het CAIA model ontwikkelt het ziektebeeld echter erg snel, waardoor de dieren dagelijks gecontroleerd, gewogen en gescoord moeten worden van dag 4 t/m dag 18.

2/ Idem bijlage 5: De dieren worden in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van compounds, in een DMII omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

[]

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

☐ Nee > Ga verder met vraag I.

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

☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Anesthesie wordt gebruikt bij de inductie van het CIA model, voor het CAIA model is dit niet nodig. Anesthesie is niet nodig voor de adoptieve transfer van cellen in ontvanger muizen (subdoel 2). Pijnstilling tijdens de ziekte inductie wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet. De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de artritis remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de artritis. Daarnaast kan het langdurig gebruik van opiaten tijdens de experimenten leiden tot veel gewichtsverlies bij de dieren.

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

[]

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1/ Er kunnen mogelijk wondjes ontwikkelen op de plaats van injectie.
- 2/ Artritis inductie (zwelling/ontsteking van de poten)
- 3/ Bloedafname tijdens het experiment.
- 4/ Euthanasie
- 5/ Behandeling met compounds bij een deel van de dieren

We verwachten geen aantasting van het welzijn van de dieren door de transfer van B en/of T lymfocyten (subdoel 2).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Af en toe kunnen wondjes ontstaan bij de staartbasis als gevolg van de immunisaties. Meestal zullen de wonden drogen en korstjes zijn binnen een week gevormd. In sommige gevallen komen de wondjes pas later tevoorschijn; wondjes kunnen een week na immunisatie verschijnen zelfs als er eerst geen wondjes zichtbaar waren. Indien de wondjes niet zichtbaar binnen een week genezen, dan wordt het dier vroegtijdig opgeofferd.

Nr 2-4 van de beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn onlosmakelijk verbonden met het beschreven dierexperiment en kunnen dus niet voorkomen worden.

Voor de behandeling met compounds zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken.

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

Wanneer wondjes ontstaan, wordt dit op het artritis score formulier genoteerd. Wanneer de wondjes niet binnen een week zichtbaar genezen, wordt het dier uit de proef gehaald.

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en gewekt voer en gel voor vocht wordt aangeboden tijdens de piek van de ziekte.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In het CIA model worden de dieren vanaf dag 18 na de eerst immunisatie 2-3 keer per week gescoord voor artritis en gewichtsverlies.

In het CAIA model worden de dieren dagelijks (dag 4 t/m 18) gescoord voor artritis en gewichtsverlies.

Gewichtsverlies wordt gebruikt als humaan eindpunt. Een verlies van 15% ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht, of twee maal achtereenvolgend 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten. Ook bij een artritis score van 12 of hoger, bij 3 volledig, gezwollen of ontstoken poten of wanneer de huid van één of meerdere poten kapot gaat, wordt de muis opgeofferd.

Wanneer wondjes die mogelijk ontstaan als gevolg van de immunisatie niet binnen een week zichtbaar genezen, wordt het dier ook uit de proef gehaald.

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

Gebaseerd op voorgaande experimenten verwachten we dat minder dan 10% van de dieren de humane eindpunten behaalt.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor de muizen waarin artritis wordt geïnduceerd is geclassificeerd als ernstig. Naar verwachting zal een deel van de muizen een minder ernstige vorm van artritis ontwikkelen door de therapeutische interventie van bijvoorbeeld Fc receptor signalering of APRIL. Ondanks dat we verwachten dat deze dieren minder ziek zullen worden dan de controle dieren, wordt het ongerief binnen het huidige classificatiesysteem ingeschaald als ernstig. Tevens zullen de dieren niet gedurende de hele looptijd van de CIA experimenten klinische symptomen vertonen, aangezien de ziekte tijd nodig heeft om te ontwikkelen na immunisatie met collageen en CFA. Verder zijn onze humane eindpunten dusdanig geformuleerd dat de muizen waarin ernstige artritis is ontstaan eerder uit het experiment worden gehaald.

Het ongerief voor de dieren waaruit de B en/of T lymfocyt populaties worden geïsoleerd voor de adoptieve transfers beschreven in subdoel 2 wordt geclassificeerd als terminaal.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Pathologische/histologische analyse wordt uitgevoerd op de weefsels, met name de achterpoten en delen van het immuunsysteem (lymfeklieren en milt)

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

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

☒ Ja



Bijlage Beschrijving dierproeven

9

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="5"/> | <input type="text" value="Experimentele autoimmuun encephalomyelitis (EAE)"/> |

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) is een model voor neuroinflammatie, waar wij binnen de onderzoeksgroep veel ervaring mee hebben (Hoek et al., 2000; Bettelli and Baeten, J Clin Invest 2006). De ziekteverschijnselen die de dieren vertonen, lijken op de klinische symptomen van multiple sclerosis. Het EAE model wordt daarom gebruikt als model voor MS.

Met het EAE model kunnen we expliciet de overige (niet antilichaam producerende) functies van B lymfocyten, zoals antigeen presentatie aan T lymfocyten, bestuderen in de context van auto-immuniteit.

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

EAE zal worden opgewekt door immunisatie met myeline, in het kort: Immunisatie met myeline (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein - MOG) eiwit of peptide (max 10ml/kg per keer, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001). Muizen worden geïmmuniseerd met MOG eiwit (B en T lymfocyt activatie) of peptide (voornamelijk T lymfocyt activatie) in Complete Freund's Adjuvant (CFA) om een immuun respons op te wekken. Tevens wordt pertussis toxine gebruikt om de bloed-hersen barrière te kunnen doorbreken (max 10ml/kg, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001).

Zodra de dieren symptomen van EAE ontwikkelen, worden de dieren dagelijks gescoord op gewicht en ziekte. EAE wordt gescoord als volgt: 0 – normaal, gezond; 1 – slappe staart; 2 – zwakte in de achterpoten of abnormaal lopen; 3 – totale verlamming in de achterpoten; 4 – verlamming van de achterpoten en gedeeltelijke verlamming van de voorpoten; 5 – overlijden. Om ethische redenen worden muizen die een score van 4 behalen meteen geëuthanaseerd, en krijgen voor de rest van het experiment score 5

toebedeeld omdat het een progressief ziektebeeld betreft. Deze dieren zouden score 5 behaald hebben wanneer ze niet geëuthanaseerd zouden zijn.

Indien nodig, kan er bloed worden afgenomen tijdens het experiment (max volume 8ml/kg eens per 2 weken, Diehl et al. J. Appl. Toxicol 2001).

Voor subdoelen 2 en 3 worden muizen behandeld met compounds die de APRIL pathway of Fc-receptor pathway activeren of blokkeren. Deze worden afhankelijk van de compound oraal, subcutaan, intraperitoneaal, of intraveneus toegediend met in acht neming van de richtlijnen beschreven in het Handboek Proefdierkunde (L.F.M. van Zutphen et al. 2012). Bij herhaaldelijke injecties wordt rekening gehouden met mogelijke inflammatie op de plaats van injectie, en indien mogelijk wordt een andere locatie genomen voor opeenvolgende injecties.

Adoptive transfer experimenten:

Afhankelijk van de specifieke onderzoeksvraag van het experiment, zullen B en/of T lymfocyt populaties worden verkregen van relevante (transgene of knock out) muizen. Deze cellen zullen vervolgens systemisch (subcutaan, in de peritoneale ruimte of intraveneus via de staartvene (Roth et al. *Journal of Experimental Biology*, 1997)) worden ingespoten in ontvanger muizen. Cel aantallen die ingespoten worden zijn afhankelijk van de B en/of T lymfocyt populaties die gebruikt worden.

De transfer van cellen vindt plaats naar ontvanger muizen alvorens EAE te induceren om de effectiviteit van de cellen in profylactische setting te bestuderen, en in dieren die al ziekte (EAE model) hebben ontwikkeld. Met de laatstgenoemde set experimenten kan worden onderzocht of bepaalde subsets van B en/of T lymfocyten gebruikt kunnen worden als cellulair vaccin tegen auto-immuunziektes. Inductie van EAE vindt plaats zoals hierboven beschreven.

De dieren worden aan het einde van het experiment geëuthanaseerd.

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

Idem bijlage 4. We verwachten dat 100% van de muizen ziekteverschijnselen vertoont na inductie van EAE.: Gegevens met betrekking tot de gemiddelden en varianties van de verschillende uitleesparameters zijn bekend uit voorgaande studies. Op basis van deze gegevens kan een groepsgrootte worden berekend, waarbij het significantieniveau α steeds op 0.05 zal worden gesteld en gebruik zal worden gemaakt van een Student's t-test, een Mann-Whitney U test of een one-way ANOVA, afhankelijk van de experimentele proefopzet, om deze groepsgrootte te bepalen.

Het minimaal te detecteren verschil tussen de gemiddelden van de behandelde en onbehandelde groep zal afhankelijk zijn van de gekozen interventie en op basis van het aanwezige vooronderzoek zo nauwkeurig mogelijk worden ingeschat.

Voorbeeld van de standaard uitgevoerde analyse binnen onze groep:

We berekenen de groepsgrootte met behulp van het programma power and precision Pro (<http://www.power-analysis.com/>). We gebruiken de twee zijdig T test voor onafhankelijke samples, met een power van 80% en een P waarde van 0.05:

Type studie: T-test

Gewenste output: Groepsgrootte

Ontwerp: Onafhankelijk

Alfa=0,05 power=0,8 DIFF=6 SIGMA=5 M=1

Groepsgrootte: 12

We kijken in ons onderzoek naar een continue uitkomstparameter van onafhankelijke controle en experimentele dieren, met 1 controle dier per experimenteel dier. In vorige onderzoeken waren de uitkomstparameters normaal verdeeld met een standaarddeviatie van 5. Wanneer het werkelijke verschil tussen de gemiddeldes van de controle en experimentele groepen 6 is, zullen we zowel 12 dieren nodig hebben in de experimentele groep en in de controlegroep om de nul hypothese, dat de populatiegemiddeldes van de experimentele en controle groepen gelijk zijn, met een kans (power) van 0,8 te kunnen verwerpen. De fout van de eerste orde (α) die in deze toetsing van de nul hypothese wordt geaccepteerd is 0,05.

B. De dieren

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

Voor de studies worden muizen gebruikt. Muizen zijn goed gekarakteriseerd voor de verschillende uitleesparameters. Muizen zijn gekenmerkt door een goede inductie van dit MS model. Er wordt gewerkt met wild type muizen dan wel met specifieke transgene dieren (overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-lymfocyt deficiënte dieren; FcR deficiënte dieren dan wel humane FcR transgene dieren).

Herkomst van de muizen is aankoop bij een gerenommeerd fokbedrijf of via eigen fok.

Levensstadium: 6 weken tot maximaal 6 maanden oud. We gebruiken zowel mannen als vrouwen.

Geschatte aantallen per doel:

Subdoel 1: Bob1 en auto-immuniteit

We hebben 12 dieren per groep nodig. Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (tabel 1). Deze experimenten worden alleen uitgevoerd indien de Bob1 overexpressie muizen in het spontane ziektemodel (bijlage 3) binnen de eerste drie maanden van tamoxifen toediening geen zichtbaar ongerief of gewichtsverlies ontwikkelen.

Tabel 1.

	Immunisatie	Follow up	n
Controle	MOG/CFA	Max. 100 dagen	12
Transgeen	MOG/CFA	Max. 100 dagen	12

We hebben 4 transgene Cre-muislijnen en 4 controle groepen. Dit komt neer op $12 \times 8 = 96$ benodigde muizen.

Subdoel 2: APRIL en auto-immuniteit

We hebben 12 dieren per groep nodig. Het eerste experiment vindt plaats met 12 APRIL-transgene muizen en 12 controle dieren (zie tabel 1). Dit komt neer op $12 \times 2 = 24$ dieren.

In het volgende experiment bekijken we de effecten van een behandeling met biologicals of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op de APRIL pathway in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Hiervoor maken we gebruik van onderstaand schema (tabel 2):

Tabel 2.

	Inductie EAE	N
A controle	profylactisch	12
B behandeling compound	profylactisch	12
C controle	therapeutisch	12
D behandeling compound	therapeutisch	12

Per compound zijn $4 \times 12 = 48$ muizen nodig. We verwachten dat 100% van de muizen ziekteverschijnselen vertoont na inductie van EAE, er hoeft in het therapeutische model dus niet gecompenseerd te worden voor dieren die geen ziekte ontwikkelen. We schatten 3 verschillende compounds (biologicals of small molecule inhibitors die interfereert met de APRIL pathway) te testen en hebben dus $3 \times 48 = 144$ dieren nodig voor dit experiment.

Geschatte aantallen voor de adoptieve transfer experimenten:

Uit eerdere studies is gebleken dat de meeste vragen beantwoord kunnen worden als 12 muizen per groep worden gebruikt. In het eerste experiment willen we aantonen dat de IL-10 specifiek geproduceerd door de APRIL-geïnduceerde B lymfocyten belangrijk is voor de bescherming tegen EAE. Om dit aan te tonen plannen we een experiment met de volgende groepen en dieraantallen (zie tabel 3):

Tabel 3:

	Genotype ontvanger muis	Genotype donor muis	N
A	B cel ^{ko} x APRIL WT	IL-10 ^{-/-} B lymfocyten	12
B	B cel ^{ko} x APRIL WT	WT B lymfocyten	12
C	B cel ^{ko} x APRIL transgeen	IL-10 ^{-/-} B lymfocyten	12
D	B cel ^{ko} x APRIL transgeen	WT B lymfocyten	12

--	--	--	--

Dit levert $4 \times 12 = 48$ dieren. Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 40 miljoen B lymfocyten uit een milt van 1 muis halen. De B lymfocyt deficiënte muizen zullen 10 miljoen B lymfocyten ontvangen. Met 1 milt kunnen dus 4 muizen behandeld worden. Er zijn 24 ontvanger muizen per genotype nodig. $24/4 = 6 + 2$ extra (ter compensatie van mogelijk verlies van B lymfocyten door het isoleren en opwerken) = 8 donormuizen/genotype. We hebben 2 genotypen voor de donor muizen, dus komen we op een totaal van $8 \times 2 = 16$ muizen.

Voor dit type experiment hebben we maximaal $48 + 16 = 64$ muizen nodig.

In het volgende experiment willen we aantonen dat de transfer van APRIL-geïnduceerde regulatoire B lymfocyten werkt als celtherapie EAE. Hiervoor maken we gebruik van een proefopzet met de volgende groepen en dieren aantallen:

	Genotype ontvanger muis	Genotype donor muis	Model	N
A	WT	WT regulatoire B cellen	profylactisch	12
B	WT	APRIL tg regulatoire B cellen	profylactisch	12
C	WT	WT regulatoire B cellen	therapeutisch	12
D	WT	APRIL tg regulatoire B cellen	therapeutisch	12

Alle ontvanger muizen in het therapeutische model moeten ziekteverschijnselen vertonen om deel te kunnen nemen aan het experiment. We verwachten dat 100% van de muizen ziekteverschijnselen vertoont na inductie van EAE. Dit komt neer op $24 + 24 = 48$ muizen.

Voor het aantal donormuizen gaan we uit van de volgende berekening: gemiddeld zullen we 3 miljoen B lymfocyten uit het peritoneum van 1 muis halen. We willen 1 miljoen B lymfocyten inspuiten in de ontvanger muis, dus $3/1 = 3$ muizen kunnen behandeld worden met B lymfocyten uit 1 donormuis. $24 \text{ muizen} / 3 = 8$, + 2 extra (ter compensatie van mogelijk verlies van B lymfocyten door het isoleren en opwerken) donormuizen per genotype nodig. We hebben 2 genotypen dus zijn er $2 \times 10 = 20$ donormuizen per model nodig.

Voor dit type experiment hebben we maximaal $48 + 20 = 68$ muizen nodig.

Voor de adoptive transfer experimenten hebben we maximaal $64 + 68 = 132$ muizen nodig

In totaal zijn voor subdoel 2: $24 + 144 + 132 = 300$ muizen nodig.

Subdoel 3: Fc receptoren en auto-immuniteit

Om de rol van Fc receptor activatie op de ontwikkeling van EAE te testen schatten we dat we 3 verschillende humane Fc receptor transgene muizen gaan gebruiken in een proefopzet zoals beschreven in tabel 1. Dit komt neer op $4 \times 12 \times 2 = 96$ dieren.

Vervolgens zullen we de effecten van een behandeling met biologicals of small molecule inhibitors (compounds) die aangrijpen op activatie van de Fc receptor testen in zowel een profylactische setting (voor aanvang van de ziekte) als therapeutische setting (als de ziekte zich gemanifesteerd heeft). Hiervoor maken we gebruik van het schema in tabel 2. We schatten 3 verschillende compounds te testen en hebben dus $3 \times 48 = 144$ dieren nodig voor experiment.

In totaal zijn voor subdoel 3: $96 + 144 = 240$ muizen nodig.

Het totaal aantal muizen dat wij nodig hebben voor deze bijlage zal $96 + 300 + 240 = 636$ muizen zijn.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

☒ Nee, ga door met vraag D.

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

--

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

☐ Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Idem als in bijlage 4:

Vervanging van deze experimenten is niet mogelijk. Er zijn geen *ex vivo* systemen beschikbaar die de complexe interacties van het immuun systeem tijdens de ontwikkeling van auto-immuniteit goed nabootsten.

Vermindering van proefdieren wordt bewerkstelligd met dit protocol door meerdere uitkomstparameters te analyseren in één dier. Zo wordt voorkomen dat meerdere studieprotocollen nodig zijn. Gebruik van het weefsel na afloop van de experimenten is zoveel mogelijk geoptimaliseerd, zodat histologie, flow cytometrie, het meten van materiaal (bv cytokines) in serum en isolatie van RNA voor gen expressie analyse (uit verschillende organen) van hetzelfde dier mogelijk is. Vermindering vindt ook plaats door experimenten te starten met 6 dieren per groep, ondanks dat de groepsgrootte statistisch is bepaald op 12. Mocht er geen verschil tussen de controle groep en de experimentele groep optreden bij gebruik van 6 muizen per groep, dan wordt het experiment niet voortgezet met de overige 6 muizen.

Verfijning wordt bewerkstelligd door de vraagstelling correct te formuleren en alleen het juiste ziektemodel te gebruiken, die de vraagstelling kan beantwoorden. Zodra ziekte ontwikkelt, wordt gel voor vocht en geweeft voer met dezelfde consistentie als het normale voer aangeboden op de bodem van de kooi. Voor de behandeling met compounds in subdoel 2 en 3 zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken om herhaaldelijk injecteren over een langere periode te voorkomen.

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

1/ Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en geweeft voer wordt toegevoegd tijdens de piek van de ziekte.

2/ Idem bijlage 1 en 4: De dieren worden in een gesloten D1 of, indien nodig vanwege gebruik van compounds, in een DMII omgeving gehuisvest. Weefsels en monsters die genomen worden van deze muizen worden in een gesloten container verplaatst naar het MLI of MLII-lab voor verdere verwerking. Deze maatregelen zijn voldoende om te voorkomen dat de beschreven experimenten nadelige effecten kunnen hebben op het milieu.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

N.v.t.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

☒ Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

☒ Nee > Ga verder met vraag H.
☐ Ja > Geef aan wat voor bedrijf of instelling dit betreft.
Waarom is hiervoor gekozen en hoe wordt een adequate huisvesting, verzorging en behandeling van de dieren gewaarborgd?

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

Valt te voorzien dat er pijn kan optreden bij de dieren?
☐ Nee > Ga verder met vraag I.
☒ Ja > Worden in dat geval verdoving, pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast?
☒ Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.
Anesthesie is niet nodig voor de inductie van dit model. Anesthesie is ook niet nodig voor de adoptieve transfer van lymfocyten in ontvanger muizen (subdoel 2). Pijnstilling tijdens de ziekte wordt niet gebruikt aangezien dit onverenigbaar is met de proefopzet (zie bijlage 4). De meeste pijnstilling werkt ontstekingsremmend en zal dus ook de EAE-geassocieerde ontsteking remmen. We kiezen ervoor om geen opiaten als pijnstilling te geven, omdat wij de bijwerkingen van het gebruik van opiaten (obstipatie, misselijkheid en sufheid) niet vinden opwegen tegen de pijn die de dieren ervaren vanwege de EAE. Daarnaast kan het langdurig gebruik van opiaten tijdens de experimenten leiden tot veel gewichtsverlies bij de dieren.
☐ Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?
1/ Er kunnen wondjes ontwikkelen op de plaats van injectie. 2/ Multiple sclerosis inductie (verlamningsverschijnselen) 3/ Bloedafname tijdens het experiment. 4/ Euthanasie 5/ Behandeling met compounds bij een deel van de dieren
We verwachten geen aantasting van het welzijn van de dieren door de transfer van B en/of T lymfocyten (subdoel 2).
Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.
Mogelijk kunnen wondjes ontstaan bij de staartbasis als gevolg van de immunisaties. Meestal zullen de wondjes drogen en korsten zullen binnen een week gevormd worden. In sommige gevallen komen de wondjes pas later tevoorschijn; wondjes kunnen een week na immunisatie verschijnen zelfs als er eerst geen wondjes zichtbaar waren. Indien de wondjes niet zichtbaar binnen een week na ontstaan zijn genezen, dan wordt het dier vroegtijdig opgeofferd.
Nr 2-4 van de beschreven vormen van welzijnsaantasting zijn onlosmakelijk verbonden met het beschreven dierexperiment en kunnen dus niet voorkomen worden. Voor de behandeling met compounds zal bij langdurige perioden met herhaaldelijke injecties overwogen worden een osmotisch pompje te gebruiken.
Beschrijf welke maatregelen worden genomen om deze schadelijke effecten te voorkomen of waar mogelijk te minimaliseren.
Wanneer wondjes ontstaan, zal dit op het EAE score formulier genoteerd worden. Wanneer de wondjes niet

binnen een week na ontstaan zichtbaar genezen, wordt het dier uit de proef gehaald.

Dieren worden niet meer gehanteerd dan uiterst noodzakelijk. De kooien worden verrijkt met tissues en huisjes om bescherming te bieden en gewekt voer en gel voor vocht wordt aangeboden tijdens de piek van de ziekte.

J. Humane eindpunten

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

☐ Nee > Ga verder met vraag K.

☒ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Tijdens het experiment worden de dieren vanaf de eerste ziekteverschijnselen dagelijks gecontroleerd en gescoord voor neurologische effecten en gewichtsverlies.

1. Gewichtsverlies wordt gebruikt als humaan eindpunt. Een verlies van 15% ten opzichte van het hoogste gemeten gewicht, of twee maal achtereenvolgende 10% gewichtsverlies worden gebruikt als humane eindpunten.
2. Bij een EAE score van 4 (dit houdt in: verlamming van de achterpoten en gedeeltelijke verlamming van de voorpoten) wordt de muis onmiddellijk geëuthanaseerd.
3. Als muizen meer dan 30 dagen EAE symptomen vertonen, worden ze geëuthanaseerd.
4. Wanneer wondjes, ontstaan als gevolg van immunisatie, niet binnen een week na ontstaan zichtbaar genezen, wordt het dier uit de proef gehaald.

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

Gebaseerd op vorige experimenten verwachten we dat minder dan 20% van de dieren deze criteria behaalt.

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief voor de muizen waarin EAE wordt geïnduceerd is geclassificeerd als ernstig. Naar verwachting zal een deel van de muizen een minder ernstige vorm van EAE ontwikkelen door de therapeutische interventie van bijvoorbeeld Fc receptor signalering of APRIL. Ondanks dat we verwachten dat deze dieren minder ziek zullen worden dan de controle dieren, wordt het ongerief binnen het huidige classificatiesysteem ingeschaald als ernstig. Daarnaast zijn onze humane eindpunten dusdanig geformuleerd dat de muizen waarin ernstige EAE is ontstaan of de muizen die langer dan 30 dagen EAE symptomen vertonen uit het experiment worden gehaald.

Het ongerief voor de dieren waaruit de B en/of T lymfocyt populaties worden geïsoleerd voor de adoptieve transfers beschreven in subdoel 2 wordt geclassificeerd als terminaal.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

☐ Nee

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

Pathologische/histologische analyse wordt uitgevoerd op de weefsels, met name de hersenen, ogen en ruggemerg en delen van het immuunsysteem (bepaalde lymfe klieren en milt)

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

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

☐ Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ AMSTERDAM



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD118002017843
Bijlagen
2

Datum 27 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 27 januari 2017. Het gaat om uw project "De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017843. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

27 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017843

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
27 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017843

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Principal Investigator/Onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
27 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017843

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u? ☒ [x] 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 maart 2017
Geplande einddatum: 28 februari 2022
Titel project: De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis
Titel niet-technische samenvatting: De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis
Naam DEC: DEC AMC
Postadres DEC: Meibergdreef 31
E-mailadres DEC: dec-amc@amc.uva.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.827,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- ☒ Projectvoorstel
- ☒ Beschrijving Dierproeven
- ☒ Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- ☒ DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Amsterdam

Datum:

27 januari 2017

Datum:

27 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017843

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 20 februari 2017 13:50
Aan: Info-zbo; [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: vraag om aanvulling bij AVD118002017843

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvullingen ontvangen. Uw aanvraag is besproken door de CCD en er is besloten uw aanvraag te vergunnen. Omdat de betaling van de leges nog niet ontvangen zijn kan de beschikking en vergunning nog niet opgestuurd worden. De behandeltijd van uw aanvraag is opgeschort totdat de leges ontvangen zijn,
 Vriendelijke groet Diane Kegler

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

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

Van: Info-zbo

Verzonden: donderdag 9 februari 2017 10:20

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: vraag om aanvulling bij AVD118002017843

Geachte [REDACTED]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw aanvraag 'De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis', met aanvraagnummer AVD118002017843. Bij de behandeling van uw aanvraag hebben wij nog een vraag voor aanvullende informatie. In bijlage 3.4.4.3 schat u het ongerief van alle dieren in als matig (100 %) , maar u voegt daaraan toe dat u niet kunt uitsluiten dat een gedeelte van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u een inschatting maken van de verdeling tussen matig en ernstig ongerief? Kunt u een aangepaste versie van deze bijlage dierproeven aan ons toesturen? De behandeltijd van uw aanvraag is opgeschort totdat het antwoord is ontvangen.

Uw aanvraag zal in de vergadering van 17 februari door de CCD behandeld worden, wij willen u vragen voor die tijd de aangepaste versie aan ons toe te sturen,

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!)

Format DEC-advies

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

A. Algemene gegevens over de procedure

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

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis**
3. Titel van de NTS **De rol en het bijsturen van witte bloedcellen (B lymfocyten) die betrokken zijn bij auto-immuunziekten zoals reuma en multiple sclerosis**
4. Type aanvraag:
 - ☒ **nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ☐ ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon **[REDACTED]**
 - e-mailadres contactpersoon **[REDACTED]**
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☐ ontvangen door DEC
 - ☐ aanvraag compleet
 - ☐ in vergadering besproken **10-11-2016**
 - ☐ anderszins behandeld
 - ☐ termijnonderbreking(en) van / tot
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☐ aanpassing aanvraag
 - ☐ advies aan CCD
7. Afstemming IvD

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

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

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

>Ja

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

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

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

> Nee

C. Beoordeling (inhoud)

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

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling (het bestuderen van B lymfocyten en (auto-)antilichamen en hun rol in auto-immuunziekten, zoals RA en MS) en kan getypeerd worden als een project met drie subdoelen die onderling geen relatie of tijdsafhankelijkheid hebben. De drie subdoelen zijn: I) De rol van Bob1 in de ontwikkeling van auto-immuniteit, en specifiek de effecten van verschillen in Bob1 expressie op B lymfocyt differentiatie en functies. II) De rol van APRIL-gemedieerde regulatoire B lymfocyten in auto-immuniteit en de identificatie van het onderliggende mechanisme in deze specifieke B lymfocyten, III) De remming van immuunactivering van macrofagen en microglia door auto-antilichamen.

De drie subdoelen dragen ieder bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De drie subdoelen zijn volledig en duidelijk uitgewerkt en elk subdoel levert een bijdrage aan het hoofddoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
> Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.
> De aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van BOB1, APRIL en Fc signalering in het functioneren van T en B cellen in de immuunrespons, maar dit wordt voornamelijk onderzocht in ziektemodellen voor reuma en MS, wat het onderzoek ook translationeel maakt.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> Het directe doel van het project is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten, zoals RA en MS. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapieën (in de toekomst) voor reuma en multiple sclerose.
Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.
5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol die B lymfocyten en (auto-) antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten (zoals reuma en MS), zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten die lijden aan reuma of MS.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.
Waarden die voor reuma of MS patiënten bevorderd worden: het ontwikkelen van therapieën voor deze ziekten.
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.
> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

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

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

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de voorgestelde ziektemodellen voor reuma en MS. Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven te kunnen uitvoeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginse- len te kunnen voldoen.

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

> De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. Er zijn al preliminaire resultaten be- haald die aanwijzingen geven dat BOB1 een rol speelt in het reumamodel en APRIL in het reuma- en MS model. In post-mortem materiaal van patiënten werd aangetoond dat macrofagen in de hersenen geactiveerd kunnen worden door antilichamen. Deze resultaten ondersteunen de doelstellingen in de ziektemodellen. Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen, De DEC verwacht dan ook dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

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

- ☐ Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)
- ☐ Niet-menselijke primaten (10e)
- ☐ Dieren in/uit het wild (10f)
- ☐ Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
- ☐ Zwerfdieren (10h)
- ☐ Hergebruik (1e, lid 2)
- ☐ Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
- ☐ Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
- ☐ Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c, lid 3)

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

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

> Er is voldaan aan bijlage III

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

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief

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

> De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen. Echter de ziektemodellen induceren wel ernstige pijn (reumamodellen; opgezwollen gewrichten) of langdurig ongerief (verlamningsverschijnselen achterpoten in MS model) waardoor het natuurlijke gedrag van het dier belemmerd zal worden.

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

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en de inschatting van het percentage dieren (<10% in reuma model en <20% in MS model) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per dierproef, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

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

> Het bestuderen van de complexe samenhang tussen B cellen, de auto-antilichamen en de verschillende celtypen in de reuma modellen en het MS model maakt het gebruik van proefdieren noodzakelijk. Vervanging van de dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van ex vivo en in vitro experimenten om het aantal proefdieren te verminderen.

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

> De aantallen dieren zijn ingeschat op basis van een power van 80% en een tweezijdige alpha van 0.05. De variatie en het te behalen verschil wordt, waar mogelijk, ingeschat op basis van eerdere experimenten. Hierdoor wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.

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

> Voor een substantieel deel van de dieren (56% [in ziektemodellen] tot 70.5% [incl. spontane ziekteontwikkeling]) kan het ongerief oplopen tot ernstig door gewrichtsontstekingen (RA) en verlamningsverschijnselen (MS model). Er wordt geen pijnstilling toegepast in de ziektemodellen omdat dat interfereert met de te onderzoeken immuunrespons (ontstekingsremmende werking van de pijnstilling) of vanwege de bijwerkingen die opiaten (misselijkheid, obstipatie, sloomheid) veroorzaken. Dit is niet verenigbaar met de proef. De dieren krijgen geweekt voer en vocht in een gelvorm op de bodem van de kooi, indien nodig. Voor het langdurig toedienen van medicatie/stoffen/middelen om de immuunrespons bij te stellen zal een osmotisch pompje worden overwogen. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

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

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.

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

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

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

> n.v.t.

NTS

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

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

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten (zoals reuma en MS), het geringe tot ernstige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele project dat gericht is op *het verkrijgen van meer inzicht in de rol die B lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten (zoals reuma en MS)*, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan reuma en MS.

De 2899 proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. De dieren zullen terminaal (22%), licht (7.5%), tot maximaal ernstig (70.5%) ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor reuma en MS. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel een substantieel aantal muizen ernstig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De gekozen ziektemodellen kunnen ernstig ongerief veroorzaken, maar de DEC erkent dat deze modellen de meest geschikte modellen zijn om deze vraagstelling in te beantwoorden. Het maatschappelijke belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in het ontstaan en het in stand houden van auto-immuunziekten. MS is een ziekte die vooral jongvolwassenen aandoet, met een zeer ernstig ziektebeeld. RA is een ernstige ziekte die

van grote invloed is op het dagelijks functioneren. Het verkrijgen van kennis over het onderliggende mechanisme van deze ziekten is noodzakelijk voor het ontwerp van nieuwe therapieën. De DEC is zich er van bewust dat het onderzoeken van de rol van B-lymfocyten een eerste stap kan zijn in de ontwikkeling van een nieuwe therapie, maar dat de uiteindelijke bijdrage van deze kennis aan een nieuwe therapie nog niet vaststaat. Deze onzekerheid is meegewogen in het advies. Het wetenschappelijke belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen.

De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis en de toepassing daarvan in twee ziektemodellen op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het maximaal ernstige ongerief van 2045 dieren staat, alsmede het gebruik van 634 proefdieren met terminaal ongerief en het 220 dieren die door de fok met onbekende uitkomst mogelijk licht ongerief zullen ondergaan. Dat het onderzoek ook nog maatschappelijke gevolgen heeft doordat de inzichten verkregen uit dit onderzoek in de toekomst kunnen worden gebruikt voor het behandelen van reumatoïde artritis en MS weegt ook mee, zij het in mindere mate.

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

De rol en moleculaire regulatie van B-lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol die B-lymfocyten en (auto-)antilichamen kunnen spelen in auto-immuunziekten, zoals RA en MS, en op langere termijn, de bijdrage aan therapeutische verbeteringen voor reuma en MS (het maatschappelijke belang), het terminale (n=634), geringe (n=220) tot ernstige (n=2045) ongerief dat de in totaal 2899 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek. Het maatschappelijke belang van de doelstelling is dat er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen van auto-immuunziekten zoals MS en RA, zodat er nieuwe therapieën ontwikkeld kunnen worden. De onzekerheid dat deze kennis daadwerkelijk bijdraagt tot een nieuwe therapie, is meegewogen in het advies. De DEC accepteert dat er nieuwe mechanismen onderzocht moeten worden om uiteindelijk een nieuwe therapie te kunnen ontwikkelen. Het exploreren van deze "ongebaande" weg is daardoor onzeker in het kader van therapie ontwikkeling, maar de uitkomst van deze proeven zal bijdragen aan meer inzicht in deze ziekteprocessen. Hierdoor kunnen ziekteprocessen beter begrepen worden wat uiteindelijk noodzakelijk is voor de behandeling ervan.

Om dit doel te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het ernstige ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt door het nabootsen van de ziekte. De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een model voor de betreffende auto-immuunziekten. Dit weegt mee in de afweging tussen het ernstig ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, niet meer gehanteerd dan ui-

terst noodzakelijk, geweekt voer en gel voor vocht wordt aangeboden tijdens ziekteperiode).

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

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

☒ **De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

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

☐ Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

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

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

☐ De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

☐ De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen

☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

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

Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

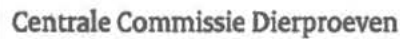
3. Omschrijf de knelpunten/dilemma's die naar voren zijn gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies zowel binnen als buiten de context van het project (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.B*).

Tijdens het beoordelen van de aanvraag is uitgebreid stilgestaan bij de afweging of het ernstige ongerief bij een substantieel deel van de proefdieren in dit onderzoek gerechtvaardigd werd door het maatschappelijk belang. Het wetenschappelijk belang was evident. Over het maatschappelijk belang is uitvoerig gediscussieerd. De toepasbaarheid van de experimentele uitkomsten voor een nieuwe therapie zijn onzeker en daardoor zou uiteindelijk het maatschappelijke belang (het ontwikkelen van nieuwe therapieën) klein kunnen zijn. Echter, tijdens de vergadering werd duidelijk dat een bevinding toch een maatschappelijk belang kan hebben ondanks dat de toepassing ervan pas in de (verre) toekomst duidelijk kan worden. Daarnaast brengt het onderzoeken van een nieuwe theorie per definitie een onzekerheid met zich mee over de uiteindelijke toepasbaarheid maar is tegelijk ook noodzakelijk om een nieuwe therapie te kunnen ontwikkelen.

De DEC heeft laten meewegen dat:

- i) er uit het voorwerk grote aanwijzingen zijn om een rol te verwachten;
- ii) het om ernstige ziektes gaat die relatief vaak voorkomen;
- iii) het ernstige ongerief dat de dieren ondergaan, wordt veroorzaakt door het nabootsen van deze (ernstige) ziekten;
- iv) dat dit onderzoek niet verricht kan worden in een alternatief model zonder deze ziekte nabootsing (en het bijbehorende ongerief);
- v) de bevindingen direct kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van een nieuwe therapie;
- vi) of indirect kunnen bijdragen doordat er meer inzicht in het ziekteproces komt.

De DEC kwam daarom tot de conclusie dat naast het wetenschappelijke belang ook het maatschappelijk belang van dit onderzoek voldoende opweegt tegen het ernstige ongerief van deze proefdieren.



Pagina 1 van 3

De beoordeling achteraf is vereist vanwege de ongeriefclassificatie ernstig.

Datum:
24 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017843

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 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.

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:

[Redacted signature block]

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Datum:
24 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017843

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Medisch Centrum

Adres: Meibergdreef 31

Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 28 februari 2022, voor het project "De rol en moleculaire regulatie van B lymfocyt populaties in auto-immuniteit, met de focus op reumatoïde artritis en multiple sclerosis" met aanvraagnummer AVD118002017843, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Onderzoeker verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 27 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2017, ontvangen op 27 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 17 februari 2017

Aanvraagnummer:
AVD118002017843

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Fok met mogelijk ongerief				
	Muizen (Mus musculus) / kruising B-cel deficiënte C57BL/6 X APRIL-transgene muizen	70	100% Licht	
3.4.4.2 Ex vivo experimenten				
	Muizen (Mus musculus) / Wild Type, overexpressie/deficiënte Bob1; APRIL transgene dieren; B-cel deficiënte dieren dan wel Fc receptor deficiënte dieren en humane Fc receptor transgene dieren	1.080	100% Terminal	
3.4.4.3 Spontane ziekte inductie + tamoxifen behandeling				
	Muizen (Mus musculus) / 6 weken - 8 maanden. Verschillende lijnen beschreven in appendix 3.4.4.3	432	100% Matig	tot max 5% van de dieren kan ernstig ongerief ondervinden
3.4.4.4 Artritis modellen (CIA en CAIA)				
	Muizen (Mus musculus) / 6 weken - max 6 maanden. Verschillende stammen zoals beschreven in bijlage 3.4.4.4	1.110	37% Terminal 63% Ernstig	
3.4.4.5 Experimentele autoimmuun encephalomyelitis (EAE)				

Aanvraagnummer:
AVD118002017843

	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / 6 weken tot 6 maanden oud. Verschillende stammen beschreven in bijlage 3.4.4.5	636	21% Terminal 79% Ernstig	
--	--	-----	-----------------------------------	--

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in afstemming met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:
AVD118002017843

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:
AVD118002017843

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

Einde van een dierproef

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

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

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.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.