

	Inventaris Wob-verzoek W17-17								
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	Documenten 2017890	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x		
2	Projectvoorstel				x	x		x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage dierproeven 1				x		x		
5	Bijlage dierproeven 2				x		x		
6	Tabel Animal Data			x					
7	DEC-advies				x		x		
8	Ontvangstbevestiging				x		x		
9	Verzoek en reactie aanvulling aanvraag				x		x		
10	Aanvulling reactie				x		x		
11	Adviesnota CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	☒ Ja > Vul uw deelnemernummer in 11600 ☐ Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Academisch Ziekenhuis Leiden</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">Leids Universitair Medisch Centrum</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>27366422</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Albinusdreef</td><td>2</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">9600</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>2300 RC</td><td>Leiden</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL11DEUT0451001400</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">LUMC</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum		KvK-nummer	27366422		Straat en huisnummer	Albinusdreef	2	Postbus	9600		Postcode en plaats	2300 RC	Leiden	IBAN	NL11DEUT0451001400		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC	
Naam instelling of organisatie	Academisch Ziekenhuis Leiden																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum																									
KvK-nummer	27366422																									
Straat en huisnummer	Albinusdreef	2																								
Postbus	9600																									
Postcode en plaats	2300 RC	Leiden																								
IBAN	NL11DEUT0451001400																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC																									
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>																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td rowspan="5"> </td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres														
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td rowspan="5"> </td><td>☒ Dhr. ☐ Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres														
(Titel) Naam en voorletters		☒ Dhr. ☐ Mw.																								
Functie																										
Afdeling																										
Telefoonnummer																										
E-mailadres																										

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.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td style="width: 50%; text-align: right;">☐ Dhr. ☐ Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.	Functie		Afdeling		Telefoonnummer		E-mailadres	
(Titel) Naam en voorletters	☐ Dhr. ☐ Mw.										
Functie											
Afdeling											
Telefoonnummer											
E-mailadres											
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	☐ Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i> ☒ 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 <i>wijziging</i> 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 <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	☐ Nee > Ga verder met vraag 3 ☐ Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Startdatum</td> <td style="width: 50%;">1 - 01 - 2018</td> </tr> <tr> <td>Einddatum</td> <td>31 - 12 - 2022</td> </tr> </table>	Startdatum	1 - 01 - 2018	Einddatum	31 - 12 - 2022		
Startdatum	1 - 01 - 2018						
Einddatum	31 - 12 - 2022						
3.2 Wat is de titel van het project?	Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.						
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	De oorzaak van zenuw schade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth						
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam DEC</td> <td style="width: 50%;">Secretariaat DEC LUMC</td> </tr> <tr> <td>Postadres</td> <td>Postbus 9600 2300 RC Leiden</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td></td> </tr> </table>	Naam DEC	Secretariaat DEC LUMC	Postadres	Postbus 9600 2300 RC Leiden	E-mailadres	
Naam DEC	Secretariaat DEC LUMC						
Postadres	Postbus 9600 2300 RC Leiden						
E-mailadres							

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- ☒ Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287,- Lege
- ☐ Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- ☐ Via een eenmalige incasso
- ☒ Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Naam	[Redacted]
Functie	Gemandateerd vergunninghouder
Plaats	Leiden
Datum	6 - 6 - 2017
Handtekening	[Redacted]



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. | 11600 |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | LUMC |
| 1.3 Vul de titel van het project in. | Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem. |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.

<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | ☒ 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

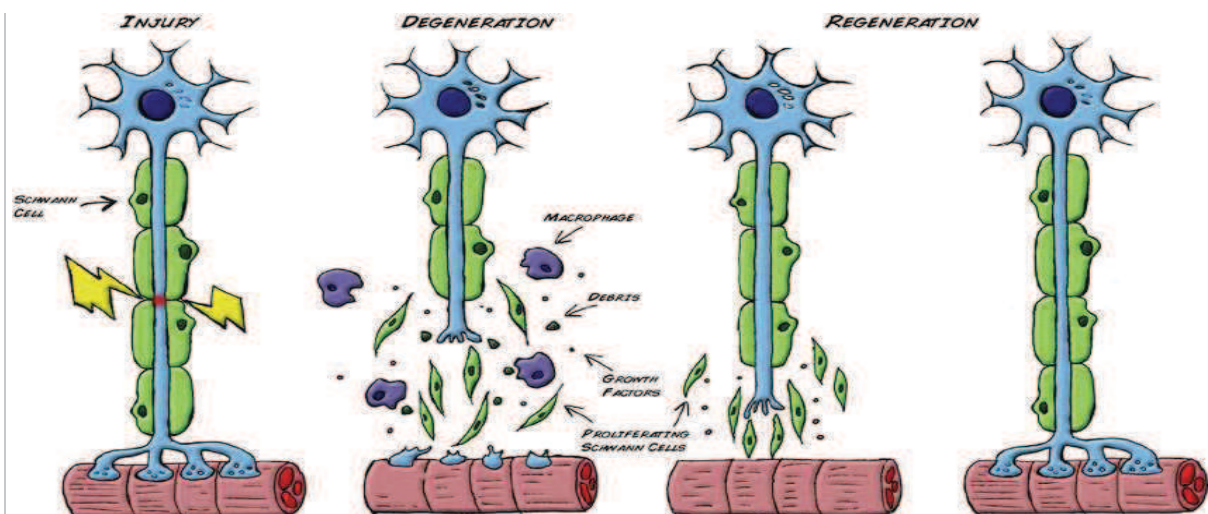
Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- 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.

In deze studie willen wij moleculaire processen die een rol spelen bij de afbraak van de myelinelaag van zenuwen zoals die ontstaat bij de **zenuwziekte CMT (Charcot Marie Tooth)** onderzoeken. CMT is een hereditaire motorische en sensorische neuropathie in het perifere zenuwstelsel. CMT komt bij zeker één op de tienduizend mensen voor. Er zijn twee vormen van deze ziekte. Bij CMT type 1 (demyeliniserend type) is primair de isolerende laag om de zenuwvezels, de myelinelaag, aangetast. Hierdoor worden de signalen minder goed doorgegeven (saltatorische geleiding via de knopen van Ranvier). Bij CMT type 2 (axonale type) zijn de zenuwvezels zelf, de axonen, aangetast. Het aantal zenuwvezels neemt uiteindelijk af in beide vormen van CMT. In deze studie bestuderen wij de processen bij CMT type 1 waar er sprake is van **verlies van de myelinelaag** van perifere zenuwen. Dit leidt tot verlammingen bij deze patiënten. Er is geen behandeling voor deze ziekte. De afbraak van de myeline laag staat ook bekend als "Wallerse degeneratie" en is vernoemd naar de ontdekker Augustus Waller die dit proces beschreef na acute zenuwschade. We weten niet precies welke moleculaire mechanismen er voor zorgen dat de myelinelaag verdwijnt. Wij weten wel dat het gen PMP22 een rol speelt. Over-expressie (duplicatie) van dit gen resulteert in CMT type 1 in zowel mensen als muizen. Wij hebben een muismodel ontwikkeld dat 3 tot 4 kopieën van het CMT gen tot expressie brengt (C3 pmp22 muizen). Deze pmp22 over-expressie resulteert in een fenotype dat erg lijkt op de ziekte CMT1A in de mens. In deze muizen is er net als in de mens sprake van demyelinisatie, een spontane langzame (chronische) afbraak van de myelinelaag die in eerste instantie wel volledig is gevormd (dus geen dysmyelinisatie). De spieren kunnen na demyelinisatie minder goed worden aangestuurd en door denervatie van de spieren zullen uiteindelijk de spieren zelf ook achteruit gaan (spier atrofie).

De myelinelaag wordt gevormd door **Schwann cellen** die om de axonen gewikkeld zitten. Deze laag beschermt de axonen en maakt saltatorische geleiding van elektrische pulsen door de zenuw mogelijk. Bij ziekte van de zenuw of schade door trauma breekt de myelinelaag af (demyelinisatie/Wallerse degeneratie). Deze afbraak van de myeline laag wordt gedaan door de Schwann cellen zelf (**autofagie**) en door **macrofagen**. Na verloop van tijd kan de myelinelaag langzaam herstellen (remyelinisatie) doordat de Schwann cellen zich weer om de axonen wikkelen. We hebben in eerder onderzoek ontdekt dat bij demyelinisatie het gen **c-Jun** in de Schwann cellen een belangrijke rol speelt (). De regulatie van autofagie van Schwann cellen door c-Jun is hier waarschijnlijk verantwoordelijk voor. Om te kunnen onderzoeken wat de bijdrage is van c-Jun gemedieerde autofagie aan het proces van demyelinisatie hebben wij een muis met c-Jun deficiëntie in de Schwann cellen gemaakt. We willen vervolgens de demyelinisatie vergelijken in de c-Jun deficiënte en sufficiënte muizen. We kijken dan zowel bij snelle/ acute demyelinisatie die wij zelf induceren door zenuwschade op te wekken als bij spontane chronische (langzame) demyelinisatie in het CMT model (C3 pmp22 muis). Op deze manier kunnen we hier precies het onderscheid maken tussen demyelinisatie en remyelinisatie omdat we bij de zenuwcrush precies weten wanneer en waar we de crush op de zenuw zetten. In het natuurlijke ziekte proces zoals we dat in de C3 pmp 22 muis bekijken zien we de een mix van degeneratie en regeneratie in de zenuw. Op deze manier kunnen wij gaan zien wat de bijdrage is van c-Jun en onderliggende moleculaire routes op de autofagie van Schwann cellen tijdens acute en chronische demyelinisatie en remyelinisatie.

Naast autofagie door de Schwann cellen spelen macrofagen een grote rol bij het afbreken en opruimen van de myeline laag. Het **complement systeem**, een onderdeel van het aangeboren immuun systeem, is verantwoordelijk voor het activeren van deze macrofagen die de myelinelaag verwijderen (Ramaglia V et al J Neurosci. 2007 Jul 18;27(29):7663-72). Ons onderzoek heeft eerder duidelijk gemaakt dat remming van het complement systeem demyelinisatie vertraagt en **herstel van de zenuw** kan versnellen (). In dit project zullen wij verder onderzoeken wat er gebeurd als wij het complement systeem remmen. Wat wij willen weten is welke moleculaire routes betrokken zijn bij het proces van demyelinisatie en remyelinisatie. Zijn de effecten van complement remming alleen van belang voor de macrofagen of misschien ook bij de autofagie door Schwann cellen? Welke andere moleculen zijn nog meer betrokken naast c-Jun en de complement factoren? Antwoorden op deze vragen kunnen nieuwe inzichten geven hoe demyelinisatie kan worden geremd en mogelijk hoe het zenuwherstel kan worden gestimuleerd.



Figuur 1: Wallerse Degeneratie. Bij schade aan zenuwen bijvoorbeeld door een acuut trauma of ziekte zoals CMT wordt de myeline laag bestaande uit Schwann cellen afgebroken. De zenuw kan zich daarna regenereren. Dit proces van regeneratie gaat echter heel langzaam bij de mens en is afhankelijk van de lengte van de zenuw. Bij denervatie van de spieren gaan deze achteruit (spieratrofie).

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?

De algemene doelstelling van dit project is om inzicht te krijgen hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën

Met dit project willen we twee doelen bereiken:

- 1) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
- 2) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van CMT in muizen in aan en afwezigheid van complement remming.

Wij denken dat deze doelen haalbaar zijn omdat onze vakgroep al 20 jaar ervaring heeft met neurodegeneratieve ziekten en diermodellen van deze ziekten. Het LUMC heeft alle faciliteiten om dit onderzoek te kunnen doen. De transgene dieren zijn beschikbaar. Voor dit onderzoek is financiering verkregen van een Nederlands fonds dat onderzoek naar neurodegeneratieve ziekten betaald.

3.3 Belang

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

De ziekte van Charcot Marie Tooth (CMT) resulteert in verlammingen en sensorische storingen bij patiënten. De verschijnselen verergeren langzaam maar blijven beperkt tot de benen en armen. Doordat de spieren in de voeten en onderbenen, later ook in de onderarmen en handen niet goed worden aangestuurd, verzwakken ze. De eerste verschijnselen treden altijd op aan ledematen die het verst van de ruggengraat afliggen. De spierkracht neemt hier als eerste af. Het lopen kost meer moeite, men struikelt vaker en enkels verzwikken gemakkelijk. De onderbenen worden zichtbaar dunner. Later kan ook de spierkracht in handen en onderarmen afnemen. Een pen vasthouden of knopen vastmaken gaat moeilijker, of mensen laten snel dingen vallen. De ernst van dit klinische beeld is echter zeer divers.

Sommige patiënten komen al op jonge leeftijd in een rolstoel terecht terwijl anderen met dezelfde aandoening op hoge leeftijd alleen wat moeilijk lopen. Deze verschillen in ernst van de ziekte is zelfs aanwezig bij patiënten met exact dezelfde genetische fout, ook binnen één familie. Het lijkt er op dat er genetische “modifiers” zijn waardoor de ziekte variabel in ernst is. De meest voorkomende oorzaak is een over-expressie van het PMP22 gen. Door inzicht te krijgen hoe demyelinisatie optreedt als gevolg van over-expressie van PMP22 hopen wij meer inzicht te krijgen in mogelijk “modifiers” die mede de ernst van de ziekte bepalen. Ons onderzoek zal in eerste instantie een wetenschappelijk belang dienen, het begrijpen van de moleculaire processen die een rol spelen bij demyelinisatie. Echter deze kennis zou een eerste stap kunnen zijn om in de toekomst therapieën te ontwikkelen die de ziekte misschien kunnen sturen richting een langzamer verloop of mildere vorm. Zodat minder patiënten in een rolstoel belanden, en met slechts geringe beperkingen een volwaardig leven kunnen hebben. Belangrijk om te vermelden is dat de verkregen wetenschappelijke kennis niet alleen van toepassing zal zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie. Denk daarbij aan Guillain Barre syndroom (GBS), amyotrofische laterale sclerose (ALS), multiple sclerose (MS) en de ziekte van Parkinson. Hoewel de oorzaken van deze zenuwziekten verschillen is het proces van het verlies van de myelinelaaag bij deze ziekten waarschijnlijk gelijk.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Wij gebruiken verschillende transgene muis modellen voor het beantwoorden van onze wetenschappelijke vragen:

Wij hebben een diemodel , [REDACTED] waarbij 3 tot 4 kopieën van het PMP22 gen tot expressie komen. Dit model geeft een zeer goed gelijkend ziekte beeld in de muis met het humane CMT type 1 [REDACTED]

Daarnaast gebruiken wij een transgene muis die geen c-Jun expressie heeft in zijn Schwann cellen. Deze c-Jun deficiënte muis is gekruist met de C3 pmp 22 muis. Uit eerdere proeven blijkt dat c-Jun activatie in Schwann cellen zenuw herstel versnelt [REDACTED],

[REDACTED] Onder c-Jun zitten mogelijk tientallen zo niet honderden genen die door c-Jun gereguleerd kunnen worden. Welke precies in Schwann cellen werken is niet bekend. Om dit uit te zoeken willen we de dubbel mutant muis gebruiken zoals beschreven in Hantke et al. Deze muis is een kruising van de c-Jun nul mutant specifiek in de Schwann cellen en onze C3 pmp 22 muis. Door deze dubbel transgene muis te vergelijken met de gewone C3 pmp 22 muis kunnen we met RNAseq ontdekken van welke genen de expressie c-Jun afhankelijk is tijdens het proces van demyelinisatie.

In deze diere modellen gaan wij daarnaast ook kijken wat het effect is van complement remming. In de C3 pmp22 muis willen wij testen of complement remming effect heeft op het verloop van de ziekte. In c-Jun-nul (specifiek in Schwann cellen) muizen willen wij kunstmatig demyelinisatie opwekken door een zenuw crush te geven. Na een zenuw crush (N. ischiadicus) treden dezelfde mechanismen in werking die demyelinisatie veroorzaken zoals dat spontaan gebeurt in de C3 pmp22 muis. Maar bij de zenuw crush kunnen we precies het onderscheid maken tussen demyelinisatie en remyelinisatie omdat we bij de zenuwcrush precies weten wanneer en waar we de crush op de zenuw zetten. In het natuurlijke ziekte proces zoals we dat in de C3 pmp 22 muis bekijken zien we de een mix van degeneratie en regeneratie in de zenuw tijdens een chronisch proces. De “Wallerse degeneratie” kunnen we dan volgen in de aan- (WT) en afwezigheid van c-Jun in Schwann cellen en in aan- en afwezigheid van complement remming en we kunnen zien hoe dit effect heeft op remyelinisatie. We gebruiken RNAseq en pathologische studies (immunohistologie) om de Wallerse degeneratie microscopisch en op moleculair niveau te volgen. De RNAseq stelt ons in staat om “pathway analyse” te doen. We kunnen met de RNAseq data moleculaire routes identificeren die mogelijk een rol spelen bij de processen die wij bestuderen. Ook kunnen wij aan de hand van de pathway analyse voorspellingen doen welke moleculaire routes eventueel therapeutisch interessant kunnen zijn. De pathologische studies dienen ter ondersteuning (bevestiging/verificatie) van de bevindingen van de RNAseq data.

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

In dit project willen we de transcriptie profielen maken van demyeliniserende zenuwen van C3 pmp22 dieren in aan- en afwezigheid van c-Jun en in aan- en afwezigheid van complement remming.

Het CMT model

C3 pmp 22 muizen ontwikkelen een vorm van CMT1a waarbij vanaf 3 weken de eerste tekenen te zien zijn. De C3 pmp22 muis wordt gekruist met een *Jun^{fl/fl}* mouse en the *P₀ Cre* muis, die de Cre recombinase onder controle van een *P₀* promotor tot expressie brengt specifiek in de Schwann cellen. Uiteindelijk genereren we een C3 *Jun^{fl/fl} P₀ Cre⁺* (C3/c-Jun-cKO muis). Deze kruisingen zijn reeds gedaan bij een externe partner, een geregistreerd fok bedrijf in de EU waar we de gewenste muizen direct kunnen bestellen.

We gebruiken de dieren voor de volgende drie experimenten.

1 Transcriptie profilering van demyeliniserende zenuwen in het C3 pmp 22 model en

C3 *Jun^{fl/fl} P₀ Cre⁺* (C3/c-Jun-cKO muizen). Dit is een terminaal experiment. Deze dieren ondergaan eigenlijk geen handelingen behalve euthanasie bij het moment van doden. We gebruiken de perifere zenuwen voor RNAseq. Op verschillende leeftijden worden de dieren gedood voor uittrekken van perifere zenuwweefsel (N. ischiadicus). Op 3 of 4 weken (na verspenen), 8 weken 12 weken en 24 weken worden dieren gedood. De tijdspunten waarop we genexpressie profielen maken zijn zo gekozen dat we alle aspecten (vroeg en late effecten) van de ziekte moeten kunnen zien. Op deze manier kan een profiel worden gemaakt van gen expressie gedurende het hele ziekte proces.

2 Zenuw Crush model in WT en c-Jun knockout muizen in aan- en afwezigheid van complement remmers. Voor het induceren demyelinisatie door Wallerse degeneratie in het perifere zenuwstelsel maken we gebruik van een klassiek **perifere zenuw crush model** waar we in de Nervus ischiadicus een crush injury geven. Dit model is vele jaren bij ons in het lab in gebruik

Toediening van complement remmers start voor de crush om er zeker van te zijn dat de remmers bij aanvang van de demyelinisatie werken. Na de zenuw crush wordt de myeline laag om de zenuw afgebroken gedurende 3-7 dagen waarna de zenuw weer herstelt. Het dier verliest met name sensorische functies in de voet en in beperkte mate ook motorische functie. Na 14 dagen is er weer volledig functioneel herstel. We volgen de dieren tot 3 weken na de crush. We gebruiken een sensorische test (footflick test) waarbij we het "gevoel" in de voet kunnen meten met elektrische schokjes. Als het dier iets voelt trekt het zijn pootje terug en dit is goed waar te nemen. In dit model kunnen we volgen wat het effect van c-Jun is en welk effect complement inhibitie heeft op het herstel in aan- of afwezigheid van c-Jun.

3 Effect van complement remming in het CMT model (C3 pmp22) en dubbel mutant dieren

C3 *Jun^{fl/fl} P₀ Cre⁺* (C3/c-Jun-cKO muizen): Behandeling met complement remmers start direct na verspenen gedurende 8 weken. We maken gebruik van ALZET osmotische pompjes voor de dosering van de complement remmers. Door gebruik te maken van Alzet pompen veroorzaken we zo min mogelijk ongerief omdat we geen complement remmers dagelijks hoeven toe te dienen middels injecties. We volgen de motorische functies van de dieren met standaard functionele testen (bijvoorbeeld grip strength, neurological score, rotarod, phenotyper en balance beam) om het verloop van de ziekte te volgen tot maximaal 24 weken en het effect van de behandeling met complement remmers te zien. We isoleren zenuwen uit de dieren op verschillende tijdstippen tijdens de proef. Zenuwweefsel wordt uitgenomen na euthanasie van de 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.

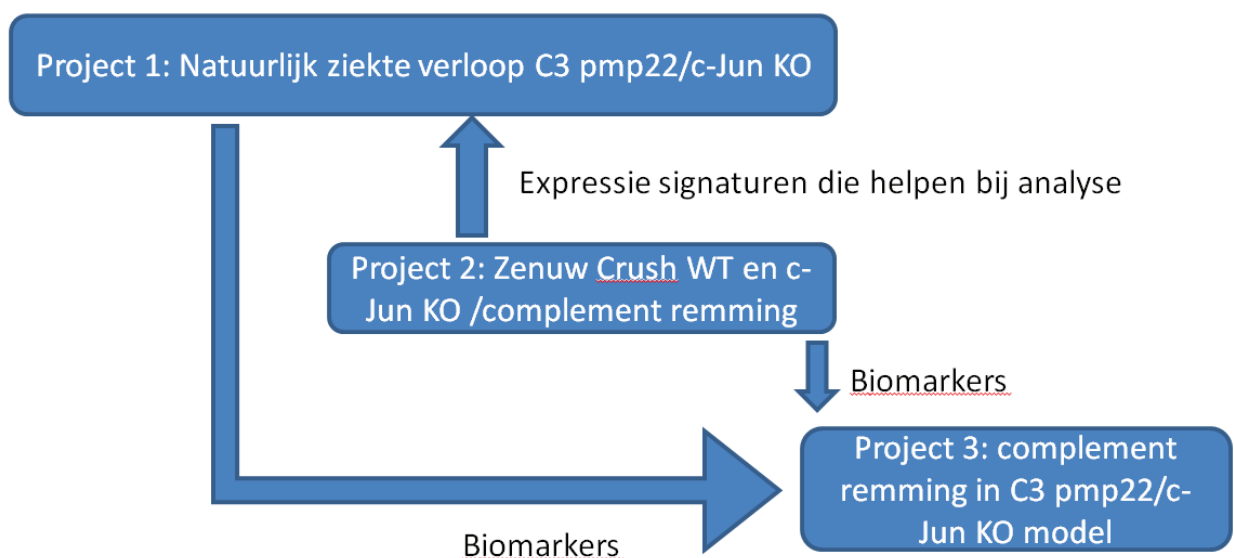
Dit onderzoek bestaat uit drie onderdelen die te samen ons een goed beeld gaan geven van de moleculaire processen tijdens demyelinisatie en de rol van c-Jun en het complement system. De proeven zijn qua uitvoering onafhankelijk van elkaar, maar de resultaten van onderdelen 1 en 2 kunnen gebruikt worden om biomarkers te definiëren die we kunnen testen tijdens onderdeel 3. De drie proeven staan in

de twee bijlagen beschreven.

Proef 1 (bijlage 1) is de transcriptie profilering van demyeliniserende zenuwen in het C3 pmp 22 model en C3 Jun fl/fl P 0 Cre + (C3/c-Jun-cKO muizen). Dit doen we tijdens de lopende fok. We isoleren RNA uit de weefsels voor RNAseq. Dit geeft ons informatie over de RNA expressie tijdens het natuurlijk verloop van de ziekte in de C3 pmp22 muis, in aan- of afwezigheid van c-Jun in de Schwann cellen.

Proef 2 (bijlage 2) geeft ons informatie over de moleculaire processen tijdens de acute fase van demyelinisatie en de daaropvolgende regeneratie. We gebruiken hier wildtype dieren voor en dieren die c-Jun negatief zijn in hun Schwann cellen. Deze dieren behandelen wij wel of niet met complement remmers. In tegenstelling tot proef één kunnen we hier precies het onderscheid maken tussen demyelinisatie en remyelinisatie omdat we precies weten wanneer en waar we de crush op de zenuw zetten. In het natuurlijke ziekte proces zoals we dat in proef 1 bekijken zien we de een mix van degeneratie en regeneratie in de zenuw. Dus proef twee kan ons helpen specifieke signaturen te bepalen waarmee we de data van proef één beter kunnen begrijpen.

Proef 3 (bijlage 1) laat ons zien of complement remming effect heeft op het natuurlijk ziekte verloop in het C3 pmp22 model en wat het effect van c-Jun is op deze behandeling. Dit geeft ons informatie of complement remming mogelijk gebruikt kan worden als therapie voor CMT patiënten. De informatie die wij hebben verkregen uit proef één en twee kunnen we gebruiken om biomarkers te selecteren die we kunnen gebruiken in project drie.



Figuur 2: Samenhang van de drie proeven (in deze figuur aangeduid als projecten)

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

Volgnummer	Type dierproef
1	C3 pmp22 model en de invloed van c-Jun expressie in de aan en afwezigheid van complement remmers
2	Zenuw crush model in wildtype en c-Jun knockout dieren; effect van complement remmers
3	

4	
5	
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.	11600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	LUMC	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	1	C3 pmp22 model en de invloed van c-Jun expressie in de aan en afwezigheid van complement remmers

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit project willen wij inzicht krijgen in de moleculaire processen die plaats vinden tijdens demyelinisatie van perifere zenuwen in een diermodel van CMT.

Wij volgen het natuurlijk verloop van een neurodegeneratieve neuropathie in de C3 pmp 22 muis, een muis model voor de ziekte CMT type 1a. Dit is **proef 1** zoals beschreven in het projectvoorstel. Wij doden dieren op gespecificeerde tijdstippen om perifere zenuwen te oogsten die we gebruiken voor de transcriptie profilering zodat we een beeld krijgen van de moleculaire processen tijdens het ziekte verloop. Dit zelfde doen wij in C3 PMP 22 dieren die zijn gekruist met c-Jun knockout dieren die specifiek geen c-Jun expressie hebben in de Schwann cellen die de myeline laag vormen (C3 *c-Jun^{fl/fl} P₀ Cre⁺*). Deze c-Jun knockout dieren hebben een verstoorde autofagie in de Schwann cellen.

Daarnaast kijken we in deze dieren of complement remming een therapeutische optie is. Dit is **proef 3** in het projectvoorstel. Uit eerder onderzoek is gebleken dat complement remming gunstig is voor de regeneratie van zenuwen. Dus wij willen testen of deze strategie werkt in het C3 pmp 22 model voor CMT en de kruising met de c-Jun knockout, Op deze manier hopen we te ontdekken of complement remming een therapeutische waarde heeft voor patiënten met de ziekte CMT.

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.

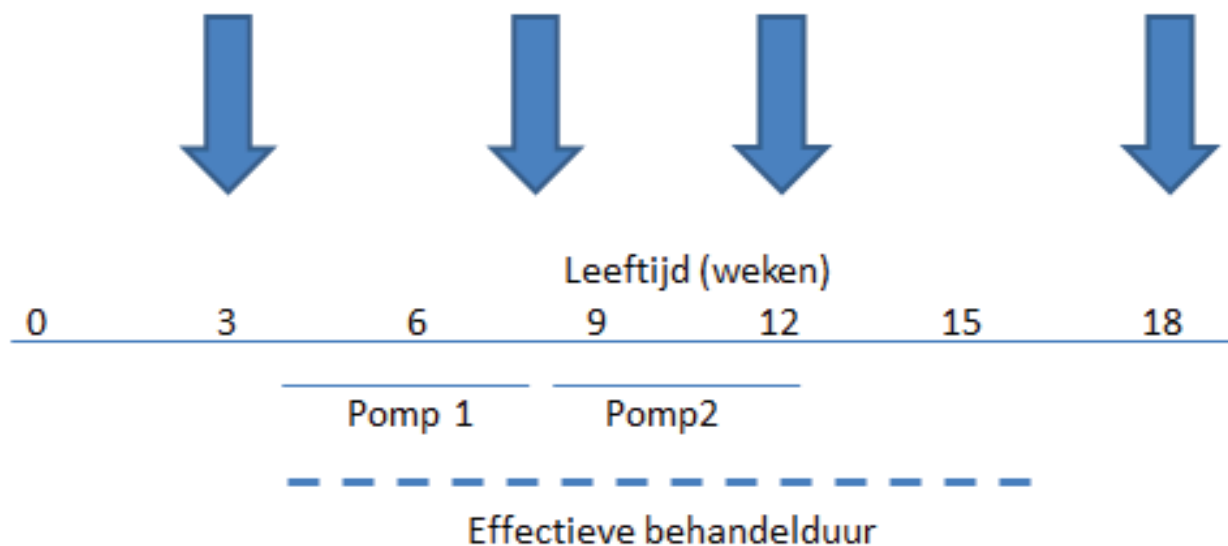
Proef 1: Zenuwen van C3 pmp22 muizen en C3 *c-Jun^{fl/fl} P₀ Cre⁺* muizen worden uitgenomen na euthanasie. We doden de dieren op 3 weken (verspenen), 8 weken 12 weken en 18 weken. Deze tijdstippen zijn zo gekozen dat wij het hele ziekte proces in beeld kunnen krijgen, Vlak voor het begin van de ziekte,

tijdens demyelinisatie en in een laat stadium van de ziekte.

Proef 3: Behandelingen met complement remmers:

Dieren worden behandeld met complement remmers. Toediening doen we subcutaan middels osmotische minipompen die subcutaan geplaatst worden onder narcose. De maat van de osmotische pompen zal worden afgestemd met de IvD. We plaatsen deze osmotische pompen in de week na verspenen zodat de behandeling start voor er vergaande demyelinisatie optreedt. We vervangen de pompen 1 malig. De complement remmers die wij gebruiken zijn stabiel en blijven ruim een maand na toediening werken. Dus met slechts twee osmotische pompen kunnen we complement tot 16 weken remmen. We willen gebruik maken van een complement C5 remmer en een C6 remmer. Er is een relevant biologisch verschil tussen C5 en C6 remming. Bij C5 remming verstoren wij ook de vorming van C5a (een chemoattractant) terwijl bij C6 remming er echt alleen remming plaats vindt op het terminale deel van het complement systeem (Membrane Attack Complex, MAC). Dit verschil heeft mogelijk effect op activatie en de attractie van perifere macrofagen.

Regelmatig meten we het lichaamsgewicht, doen wij neurologische motor testen en controleren wij de dieren op hun algemene uiterlijk.



Figuur 1: Schematische weergave van de proefopzet. De pijlen geven het moment van doden aan voor de analyse van genexpressie. De effectieve werking (behandelduur) van de complement remmers is langer dan de tijdsduur van afgifte door de pompen, omdat de complement remmers die wij gebruiken langdurig werken.

We volgen de motorische functies van de dieren met standaard functionele testen (grip strength, neurological score, balance beam, rotarod, phenotyper kooi en hanging wire) om het verloop van de ziekte te volgen tot maximaal 18 weken en het effect van de behandeling met complement remmers te zien. Deze testen zijn gevalideerd voor het C3 pmp22 model in eerder onderzoek. De testen worden om de 3 weken herhaald vanaf week 4. De "grip strength" test is een simpele test waar de muis wordt geplaatst op een metalen gridje waar hij zich goed kan vasthouden. Het gridje is verbonden aan een newtonmeter die de kracht meet die op het gridje staat. Door aan de staart van de muis langzaam naar achteren te trekken kunnen we dan meten hoe goed de muis zich kan vasthouden en bij welke kracht hij moet loslaten (figuur 2 laat pilot data van deze assay zien). Bij de "balance beam" lopen de dieren over een small stokje en kijken we hoe goed ze blijven staan of lopen. Sensorimotorische coordinatie wordt gemeten door de tijd te meten die nodig is om het stokje over te lopen en het aantal misstappen te tellen. Een gezonde muis heeft geen enkele moeite met deze oefening maar dieren met een neuropathie maken steeds meer fouten en lopen langzamer over het stokje. De neurological score is een punten systeem waar we scoren op het uiterlijk van de muis. Of ze slepen met hun pootjes, de houding van de staart en of er een tremor te zien is:

Neurologische Score:

Pelvic elevation (0-3):

- 0: Markedly flattened
- 1: Barely touches floor
- 2: Normal (3 mm)
- 3: Elevated (>3 mm)

Tail elevation (0-3):

- 0: None, dragging
- 1: Horizontally extended
- 2: Diagonally elevated, 45 degrees
- 3: Vertically upright, 90 degrees
- 4: Diagonally retrograde, 135 degrees

Hindlimb splay (0-3):

- 0: None (normal)
- 1: Moderate
- 2: Marked

Tremor (hindlimbs/tail) (0-2):

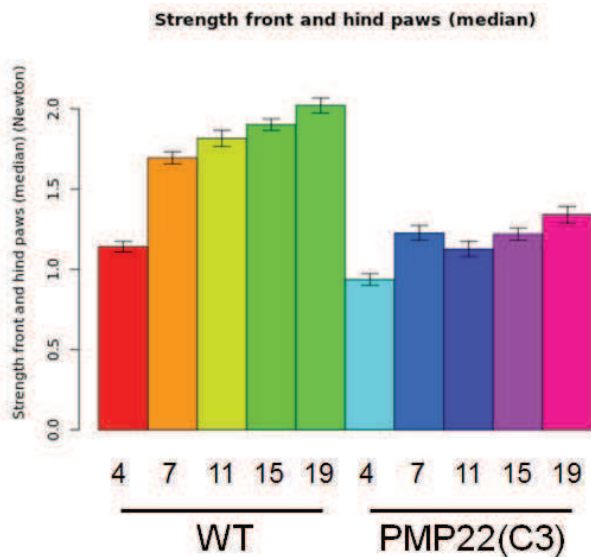
- 0: None (normal)
- 1: Moderate
- 2: Marked

Bij de Hanging wire test moeten de dieren hangen aan de voorpoten aan een strak gespannen koord. De tijd wordt gemeten totdat ze vallen. Een gezonde muis zal direct met alle pootjes op de draad klimmen. Maximaal tijdsduur van de test is 180 seconden.

Bij de standaard rotarod test moeten dieren op een draaiende cylinder blijven lopen die met toenemende draaisnelheid van 4 tot 40 rpm ronddraait. De tijd en snelheid van de rotarod waarop dieren het niet meer kunnen bijbenen en van de cylinder vallen wordt bepaald.

De phenotyper kooi is een systeem waarbij de dieren vrij bewegen door een speciale kooi waarbij al hun bewegingen gevolgd worden door een camerasysteem verbonden aan een computer waarbij de normale activiteit van de dieren (loopafstand, rusttijd) gemeten kan worden. Per meting worden dieren gedurende 1 dag/ nacht individueel huisvest.

We isoleren zenuwen uit de dieren op verschillende tijdstippen tijdens de proef. Zenuwweefsel voor analyse wordt uitgenomen na euthanasie van de muizen.



Figuur 2: Grip strength analyse van C3 pmp 22 muizen vs WT dieren. Er is gemeten op 4-19 weken leeftijd. N=16 dieren per groep

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

De hoeveelheid RNA die we uit de Nervus ischiadicus kunnen isoleren is bepalend is voor het aantal dieren dat nodig is.

Isolatie van weefsels voor RNAseq: Om voldoende RNA te kunnen isoleren uit de N.ischiadicus van muizen is onze ervaring dat er minimaal 10 dieren nodig zijn per tijdspunt. RNA extractie uit perifere zenuwen gaat relatief moeizaam door de myeline (vetten in de myeline laag). Daarnaast is de opbrengst van RNA bij zieke dieren relatief laag door verlies van Schwann cellen.

Testen van complement remmers: Er zijn zestien dieren nodig per groep. Dit komt voort uit praktische overwegingen. Voor RNA isolaties hebben we minimaal 10 dieren nodig omdat het onze ervaring is dat de RNA isolaties uit de N. ischiadicus lage opbrengsten hebben zeker bij zieke dieren. Daarnaast willen wij weefsel gebruiken voor pathologie. Drie dieren voor paraffine en drie dieren voor vriescoupes. Zestien dieren is ruim voldoende voor statistische significante bij de functionele testen (grip strength, balance beam en neurologische score). Een power analyse (power 0.8 met een significantie van $p=0.05$) gebruik makend van de resultaten van de grip strength analyse uit eerdere proeven (figuur 2) laat zien dat we minimaal 12 dieren per groep nodig hebben om significante verschillen te meten in deze test op een leeftijd van 4 weken. Dus de zestien dieren die we uit puur praktische overwegingen nodig hebben zullen voldoende zijn voor functionele testen.

We doen alle testen met de beide geslachten. Dit doen we echter in aparte proeven waarbij we de geslachten apart testen omdat we uit eerder onderzoek weten dat het complement systeem en dan met name het terminaal complement systeem (C6 en C9) lager tot expressie komt in vrouwen. Expressie van terminaal complement kan een factor 10 verschillen tussen mannen en vrouwen. De groepsgrootte voor de proeven met mannen of vrouwen is gelijk.

B. De dieren

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

We gebruiken muizen omdat deze dieren een vergelijkbaar aangeboren immuun systeem hebben zoals de mens en in deze dieren verloopt Wallerse degeneratie min of meer gelijk aan de mens. Muizen zijn verder handig in dit soort experimenten omdat ze sneller herstellen dan bijvoorbeeld ratten (of andere grotere dieren). Dit komt omdat de lengte van de aangedane zenuw korter is bij muizen in vergelijking tot grotere dieren of mensen. Dit maakt het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid.

Muizen vanuit (commerciële) fok EU en eigen fok. Leeftijd tussen de 3-18 weken. We gebruiken wildtype dieren (C57/Bl6 achtergrond), en muizen met relevante mutaties zoals C3 PMP 22 dieren, en de C3 PMP22 $c-Jun^{fl/fl} P_0 Cre^+$ muis die geen c-Jun tot expressie brengt in de Schwann cellen.

RNA isolaties/RNAseq van de N. Ischiadicus tijdens natuurlijk verloop ziekte in C3 pmp 22 en C3 $c-Jun^{fl/fl} P_0 Cre^+$.

Totaal aantal dieren: 4 tijdstippen x 10 dieren x 2 geslachten x 3 stammen=240 dieren

Testen complement remmers

De proeven worden gedaan in aan- of afwezigheid van complementremmers. We willen gebruik maken van onze complement remmers: een C5 remmer en een C6 remmer

Totaal aantal dieren:

Uitgaande van bovenstaande verwachten wij voor dit deel van het onderzoek: 16 dieren x 3 (C5 remmer, C6 remmer, controle) x 2 stammen x 2 geslachten =192 dieren.

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

In dit project onderzoeken wij demyelinisatie, neurodegeneratie en regeneratie. In het verleden hebben wij gewerkt met in vitro co-culturen van zenuwcellen en Schwann cellen. Myelinisatie is echter in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen. Onze ervaring is dus dat dit soort processen niet goed in vitro kunnen worden bestudeerd. Het zenuwstelsel is een complex weefsel waar vele celtypen aanwezig zijn en waar ook immuun cellen worden gerecruteerd vanuit de bloedsomloop bij een ontsteking. Op al die cellen heeft het aangeboren immuunsysteem waaronder het complement systeem een interactie. Door de bloed zenuw barrière zijn er effecten van zowel het interne (residente) immuun systeem als het externe (systemisch) immuun systeem. *Vervanging* met alleen *in vitro modellen* is dus niet mogelijk om een goed antwoord te krijgen op onze vragen.

Vermindering

Bij het ontwerp van onze proeven gebruiken wij zo min mogelijk dieren door heel specifiek minimaal benodigde dieren aantallen te bepalen uitgaande van onze ervaring betreffende praktische zaken (bijvoorbeeld RNA opbrengst uit weefsel) en door gebruik te maken van statistische methoden zoals de power analyse .

Verfijning

We kiezen bewust voor deze knaagdiermodellen als een vorm van *verfijning* omdat deze modellen zeer reproduceerbaar zijn en geschikt zijn om de demyelinisatie te volgen dat op dezelfde manier plaats vindt in mensen met een degeneratieve zenuwziekte.

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 muizen worden sociaal gehuisvest en materiaal om zich te verstoppen of mee te spelen is aanwezig. Dieren worden verdoofd en krijgen pijnbestrijding voor alle ingrijpende handelingen. De dieren worden goed gecontroleerd tijdens de proef om te voorkomen dat ze over de humane eindpunten gaan. Onze ervaring is dat het C3 pmp 22 muis model geen problemen heeft bij het eten of drinken in normale standaard kooien. Er zijn verder geen gevaren voor 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.

NVT

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.

Dieren worden verdoofd (anesthesie) voor ingrepen en krijgen perioperatieve pijnbestrijding.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De muismodellen die wij gebruiken hebben een perifere neuropathie die erg lijkt op CMT type 1A bij de mens. Dit betekent dat de dieren een toenemend licht verlies van spierkracht ondervinden. Tussen 3 en 7 weken begint dit zichtbaar te worden in testen. Net als bij mensen is het fenotype over het algemeen vrij mild. Echter in de kruising met de c-Jun knockout kan het fenotype wat sterker zijn. In geen geval heeft dit effect op het vermogen van de muis om voor zichzelf te zorgen. Onze ervaring is dat de dieren geen problemen hebben tot en met de leeftijd van 8 maanden. Voor de zekerheid laten we dieren niet ouder worden dan die 8 maanden. Osmotische pompen die subcutaan worden geplaatst worden goed verdragen. Ook bij het vervangen van de pomp is er in onze ervaring nooit een probleem.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Perifere neuropathie

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

Dieren worden regelmatig gecontroleerd. Humane eindpunten zijn zodanig gedefinieerd dat het ongerief nooit groter wordt dan matig.

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.

Samen met de IvD zal een score tabel worden opgesteld voor de toepassing van de eindpunten.

Plotseling verlies lichaamsgewicht (>15% tov hoogst gemeten gewicht). Uiterlijke kenmerken die wijzen op ziekte 24 uur na crush (bol zitten, pilo-erectie etc). Ontsteking bij de osmotische pomp.

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

Onze ervaring is dat het lager dan 5% zal zijn.

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.

Progressie van ziekte (verlies spierkracht): licht ongerief (alle=432 dieren)

Functionele testen: licht ongerief (192 dieren)

Plaatsen en vervangen van pompen onder anesthesie: licht ongerief (192 dieren)

Doden voor isolatie van weefsels: licht ongerief (alle)

Cumulatief : Alle dieren ondervinden cumulatief matig 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.

We hebben hun zenuwen nodig voor onderzoek

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.	11600	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	LUMC	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Zenuw crush model in wildtype en c-Jun knockout dieren; effect van complement remmers

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De bijlage beschrijft **proef 2** zoals vermeld in de projectaanvraag. Wij willen inzicht krijgen in de moleculaire processen die plaats vinden tijdens demyelinisatie van perifere zenuwen door Wallerse degeneratie en de daaropvolgende regeneratie. Wij willen specifiek weten de processen zien in dieren die een verstoorde autofagie in de Schwann cellen hebben door gebrek aan expressie van c-Jun in vergelijking met wildtype dieren. Daarnaast kijken we welke invloeden complement remmers hebben op deze processen. Het doel is om zo zicht te krijgen op processen die de degeneratieve zenuwziekte CMT veroorzaken en een eventuele therapeutisch gebruik van complement remmers.

Voor het induceren van neuro-inflammatie na trauma in het perifeer zenuwstelsel maken we gebruik van een klassiek perifere zenuw crush model waar we in de Nervus ischiadicus een crush injury geven (zie figuur 1 hieronder). Dit model is vele jaren bij ons in het lab in gebruik

Na pre operatieve analgesie kan de zenuw eenvoudig onder volledige narcose worden vrijgeprepareerd in het achter dijbeen van de muis. Na de zenuw crush (door gestandariseerd met een gladde pincet te knijpen) wordt de zenuw voorzichtig tussen de spierlagen terug geplaatst en wordt de wond gehecht. De zenuw in het andere dijbeen die niet gecrushd wordt dient als controle. Initieel is er weinig te zien aan het dier na ontwaken. Het dier loopt normaal. Primaire meetwaarde voor het volgen van het verloop van zenuwschade is het meten van de sensorische functie. Dit meten we via een "footflick test" waarbij met een electrode elektrische stroomstootjes (pijnprikkels) kunnen worden gegeven (De Koning et al J. Neurol. Sci., 74 (1986), pp. 237-246) op de voetzool van het dier. Bij het optreden van neuro-inflammatie en Wallerse degradatie van de myeline laag verliest het dier gevoel bij de voetzolen en reageert het niet meer op prikkels. Na 3 dagen is dit effect maximaal waarna langzaam herstel op treedt. Uiteindelijk is er volledig herstel van alle functies binnen 2 weken. In afwezigheid van complement is dit herstel 1 week

eerder dan in wildtype dieren [REDACTED] We remmen complement wel of niet door gebruik te maken van remmers die complement factor C5 of C6 remmen en dieren die C5 of C6 deficiënt zijn en nemen we weefsel monsters na offeren van het dier op verschillende tijdstippen voor RNA isolatie en RNAseq.

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.

Behandelingen met complement remmers:

Dieren worden voor inductie van trauma behandeld. Toediening doen we subcutaan middels osmotische minipompen die subcutaan geplaatst worden onder narcose of subcutane injecties 3 x per week. De maat van de osmotische pompen zal worden afgestemd met de IvD. Bij het gebruik van pompen krijgen de dieren 1 malig 1 pomp die 1 week voor de crush geplaatst wordt. We willen gebruik maken van een complement C5 remmer en een C6 remmer. Er is een relevant biologisch verschil tussen C5 en C6 remming. Bij C5 remming verstoren wij ook de vorming van C5a (een chemoattractant) terwijl bij C6 remming dit niet gebeurt en er echt alleen vorming van het membrane attack complex, het terminale deel van het complement systeem, wordt voorkomen. Dit verschil heeft effect op activatie en de attractie van perifere macrofagen.

Handelingen zenuw crush model:

Het model is beschreven in [REDACTED]

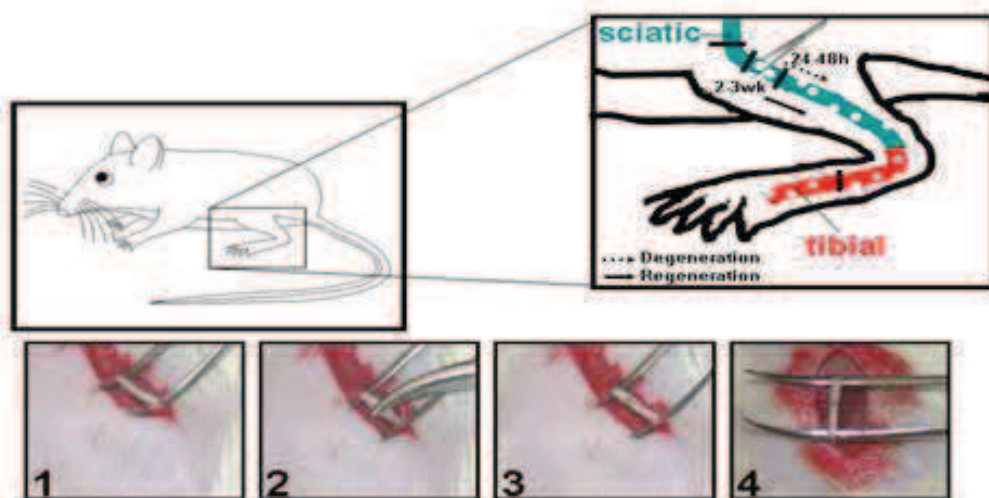
Dieren krijgen vooraf analgesie.

De dieren worden onder narcose gebracht (gas anesthesie)-

De dijbeen van het dier wordt geschoren. De Nervus ischiadicus wordt vrijgeprepareerd (figuur 1). Met een gladde pincet wordt in de zenuw geknepen. Dit is een gestandariseerde en reproduceerbare procedure. In voorgaand onderzoek hebben wij de crush procedure gestandariseerd met behulp van speciale pincetten waarbij de kracht van de crush elektronisch gemeten kan worden [REDACTED].

De zenuw wordt terug geplaatst tussen de spierlagen en de wond wordt gehecht.

Eventueel kan met een kleine ligatuur van zwart hechtdraad de plek van crush worden aangegeven op de zenuw zodat deze later makkelijker is terug te vinden. De andere poot dient als controle. De zenuw wordt vrijgeprepareerd maar niet gecrushd.



Figuur 1: Schematische weergave van het nerve crush model waarbij de nervus ischiadicus met behulp van een pincet wordt gecrushd (1-4). Wallerse degeneratie en neuro-inflammatie tredt op in de eerste 24-48 uur na crush. Herstel van de zenuw kost 2 weken als MAC geremd wordt of 3 weken als er geen MAC remming is.

Direct na crush als de dieren weer wakker zijn is er weinig te zien aan de dieren. Verstoring van met name sensorische functie treedt meestal op na 24 uur. Dieren kunnen dan ook een beetje gaan slepen met het pootje. Herstel is 100% na 2 weken.

Regelmatig meten we het lichaamsgewicht en de sensorische functie.

Handelingen footflick testen (meten sensorische functie):

Bij de footflick test wordt een elektrode gehouden tegen de achterpoot van het dier. Een elektrisch stroompje wordt langzaam opgevoerd totdat een pijn prikkel (elektrische schokjes) door het dier ervaren wordt en hij zijn pootje terugtrekt. De hoeveelheid stroom die nodig is om een sensorische reactie uit te lokken is een maat voor de gevoeligheid van het pootje. Dieren worden na een zenuw crush ongevoelig voor pijnprikkels en dit gevoel keert langzaam weer terug als de zenuw herstelt. Dus het meten van de terugkeer van sensorische functie gebruiken wij als een maat voor zenuwherstel.

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

Er zijn per tijdstip 10 dieren nodig, uit ervaringen van eerdere projecten. Elk dier is zijn eigen controle. 1 pootje ondervindt de crush, het andere pootje dient als controle. Dit geldt voor alle proeven/ bepalingen. Voor het meten van effecten op regeneratie snelheid (bijvoorbeeld als we behandelingen willen testen) geldt een minimale grootte van 9 per functionele analyse groep. Er kan dan significant verschil in de footflick functie gemeten worden (power 80%). We meten dan in de footflick het verschil in elektrische stroom (micro Ampere) waarbij dieren blijf geven van sensorische functie in de voet. Uit eerder proeven blijkt bijvoorbeeld dat op dag 12 na crush onbehandelde dieren reageren bij een stroom van 340 uA en dat met complement remmers behandelde dieren reageren bij 200 uA met een SD van 100. Met 10 dieren per tijdstip kunnen we onverhoopte uitval opvangen.

B. De dieren

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

We gebruiken muizen omdat deze dieren een vergelijkbaar aangeboren immuun systeem hebben zoals de mens en in deze dieren verloopt Wallerse degeneratie min of meer gelijk aan de mens. Muizen zijn verder handig in dit soort experimenten omdat ze sneller herstellen dan bijvoorbeeld ratten (of andere grotere dieren). Dit maakt het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid. We gebruiken in dit deel van het onderzoek zowel mannelijke en vrouwelijke dieren. Omdat complement niveaus lager zijn in vrouwen (factor 10) moeten de proeven apart gedaan worden voor mannen en vrouwen. De groepsgrootte voor de proeven met mannen of vrouwen is gelijk.

Muizen vanuit (commerciële) fok EU. Leeftijd tussen de 8-12 weken. We gebruiken wildtype dieren (C57/Bl6 achtergrond) en een relevante mutante stam zoals de *c-Jun^{fl/fl} P₀ Cre⁺* muis die geen c-Jun tot expressie brengt in de Schwann cellen.

De proeven worden gedaan in aan- of afwezigheid van complementremmers. We willen gebruik maken van onze complement remmers: een C5 remmer en een C6 remmer

Uit eerder onderzoek weten wij welke tijdstippen belangrijk zijn. We plannen de tijdstippen als volgt: 6 uur, 24 uur, 48 en 72 uur, 1 week en 2 weken na trauma.

Totaal aantal dieren:

Uitgaande van bovenstaande verwachten wij voor dit deel van het onderzoek: 6 tijdstippen x 10 dieren x 2 (C5 remmer, C6 remmer) x 2 stammen x 2 geslachten = 480 dieren.

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

In dit project onderzoeken wij demyelinisatie, neurodegeneratie en regeneratie. In het verleden hebben wij gewerkt met in vitro co-culturen van zenuwcellen en Schwann cellen. Myelinisatie is echter in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen. Onze ervaring is dus dat dit soort processen niet goed in vitro kunnen worden bestudeerd. Het zenuwstelsel is een complex weefsel waar vele celtypen aanwezig zijn en waar ook immuun cellen worden gerecruteerd vanuit de bloedsomloop bij een ontsteking. Op al die cellen heeft het aangeboren immuunsysteem waaronder het complement systeem een interactie. Door de bloed zenuw barrière zijn er effecten van zowel het interne (residente) immuun systeem als het externe (systemisch) immuun systeem. *Vervanging met alleen in vitro modellen* is dus niet mogelijk om een goed antwoord te krijgen op onze vragen.

Vermindering

Bij het ontwerp van onze proeven gebruiken wij zo min mogelijk dieren door heel specifiek minimaal benodigde dieren aantallen te bepalen uitgaande van onze ervaring betreffende praktische zaken (bijvoorbeeld RNA opbrengst uit weefsel) en door gebruik te maken van statistische methoden zoals de power analyse .

Verfijning

We kiezen bewust voor deze knaagdiermodellen als een vorm van *verfijning* omdat deze modellen zeer reproduceerbaar zijn en geschikt zijn om de demyelinisatie te volgen dat op dezelfde manier plaats vindt in mensen met een degeneratieve zenuwziekte. Het betreft een nauwkeurig model met een interne controle (het andere achterpootje).

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 muizen worden sociaal gehuisvest en materiaal om zich te verstoppen of mee te spelen is aanwezig. Dieren worden verdoofd en krijgen pijnbestrijding voor alle ingrijpende handelingen. De dieren worden goed gecontroleerd tijdens de proef om te voorkomen dat ze over de humane eindpunten gaan. Er zijn geen gevaren voor 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.

NVT

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.

Dieren worden verdoofd voor ingrepen en krijgen pijnbestrijding.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In dit muis model wordt traumatisch letsel in het perifere zenuwstelsel opgewekt. Dit heeft gevolgen voor met name de sensorische functies in de aangedane poot. De dieren verliezen gevoel in dat pootje. Bij gebruik van ratten in een dergelijk model is onze ervaring dat ze wel eens gaan knagen aan hun eigen gevoelloze pootje, maar bij muizen hebben we dit nog nooit gezien. We letten er echter wel goed op en mocht het toch gebeuren dan kunnen we de pootjes insmeren met middelen die heel vies smaken (Bite-X). In het zenuw crush model zijn er volgens onze ruime ervaring geen complicaties te verwachten. Het enige denkbare is dat de wond geïnfecteerd raakt maar dat hebben we in al die jaren dat we het model gebruiken nog nooit gezien. Er is mogelijk sprake van stress, voor een vluchtdier als de muis, als gevolg van het uitvallen van de spierfunctie in de pootjes.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1 Neuraal trauma, 2 Infectie wond, 3 automutilatie.

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

Dieren worden dagelijks gecontroleerd. In het geval van knagen aan de eigen poten gebruiken we Bite-X. Humane eindpunten zijn zodanig gedefinieerd en worden toegepast dat het ongerief matig blijft.

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.

Ontstekingen aan de poot, automutilatie. Plotseling verlies lichaamsgewicht (>15% tov hoogst gemeten gewicht). Uiterlijke kenmerken die wijzen op ziekte 24 uur na crush (bol zitten, pilo-erectie etc). Samen met de IvD zal een score tabel worden opgesteld voor de toepassing van de eindpunten.

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

Maximaal 10%

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.

Zenuw crush: matig ongerief (alle=480)

Functionele testen: licht ongerief (alle dieren)

Plaatsen van pompen onder anesthesie of injecties : licht ongerief (alle)

Doden voor isolatie van weefsels: licht ongerief (alle)

Cumulatief : Alle dieren ondervinden uiteindelijk matig 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.

We hebben hun zenuwen nodig voor onderzoek

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

animal data for Dier Experimenten Commissie

project number:	AVD116002017890
title:	Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.
responsible scientist:	

[illegible]

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017890
2. Titel van het project: Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.
3. Titel van de NTS: De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth.
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 12-04-2017
 - ☒ aanvraag compleet: 12-04-2017
 - ☒ in vergadering besproken: 04-05-2017
 - ☐ anderszins behandeld:
 - ☒ termijnonderbreking(en) 26-05-2017 t/m 30-05-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 30-05-2017
 - ☒ advies aan CCD: 01-06-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 26-05-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:
De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de meerwaarde van RNAseq, de noodzaak van 2 modellen, het maatschappelijke belang, het verwijderen van de minipompjes, het ongerief, het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, de verfijning en de humane eindpunten.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Wat is een project': Het onderzoek bestaat uit drie onderdelen die samen een goed beeld geven van de moleculaire processen tijdens demyelinisatie en de rol van c-Jun en het complement system. De proeven zijn qua uitvoering onafhankelijk van elkaar, maar de resultaten van onderdelen 1 en 2 kunnen gebruikt worden om biomarkers te definiëren die getest kunnen worden tijdens onderdeel 3. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is tweeledig:
 - a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaaag mogelijk maken.
 - b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.Het uiteindelijke doel is om inzicht te krijgen hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat remming van het complement systeem demyelinisatie vertraagt en herstel van de zenuw kan versnellen. Het is echter niet bekend welke moleculaire routes betrokken zijn bij het proces van demyelinisatie en remyelinisatie. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd zijn de proefdieren, de onderzoekers

en de patiënt en diens naasten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen over de moleculaire processen die een rol spelen bij demyelinisatie. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: de verkregen kennis zou een eerste stap kunnen zijn om in de toekomst therapieën te ontwikkelen die de ziekte kunnen sturen richting een langzamer verloop of mildere vorm. Hierdoor belanden minder patiënten in een rolstoel en zouden zij met geringe beperkingen een volwaardig leven kunnen hebben. Daarnaast kan de verkregen wetenschappelijke kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals bij ALS, MS en de ziekte van Parkinson.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot neurodegeneratieve ziekten en diermodellen van deze ziekten. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Daarnaast zijn er subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van een afwijkende locatie en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van de zenuw crush matig ongerief ondervinden. Van het fenotype, het plaatsen en vervangen van

de minipomp onder anesthesie en de functionele testen ondervinden de muizen gering ongerief. Naar inziens van de DEC zullen alle dieren echter cumulatief matig ongerief ondervinden. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal een groot aantal dieren een operatie ondergaan waarbij er een minipomp subcutaan geplaatst wordt. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diersmodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diersmodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende diersproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Muizen hebben een aangeboren immuun systeem vergelijkbaar met de mens. Daarnaast herstellen muizen sneller dan bijvoorbeeld ratten. Hierdoor is het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid. Het gekozen muismodel brengt 3 tot 4 kopieën van het CMT gen tot expressie wat resulteert in een fenotype dat erg lijkt op de ziekte CMT1A in de mens. In deze muizen is er net als in de mens sprake van demyelinisatie, een spontane langzame afbraak van de myelinelaag die in eerste instantie wel volledig is gevormd. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren. Myelinisatie is in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van diersproeven. Zo heeft elk dier in het zenuwcrush model zijn eigen interne controle waardoor er geen extra controle groepen nodig zijn. Naar inzien van de DEC is de strategie helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van diersproeven en is zo opgezet dat de diersproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven diersproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate gebruiken. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De zenuwen worden geïsoleerd voor verdere analyse. Dit is van essentieel belang om de experimenten goed te beoordelen en is niet mogelijk zonder het dier te doden. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het directe doel, te weten:
 - a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
 - b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.Met als uiteindelijke doel het verkrijgen van meer inzicht over hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.

Waarden die voor de patiënten (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

De ziekte van Charcot Marie Tooth (CMT) is een hereditaire motorische en sensorische neuropathie in het perifere zenuwstelsel die resulteert in verlammingen en sensorische storingen bij patiënten. CMT komt bij zeker één op de tienduizend mensen voor. De ernst van het klinische beeld is echter zeer divers. Sommige patiënten komen al op jonge leeftijd in een rolstoel terecht terwijl anderen met dezelfde aandoening op hoge leeftijd alleen meer moeite hebben met lopen of vaker struikelen. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. De DEC acht het verkrijgen van meer inzicht in welke processen een rol spelen bij de afbraak van de myelinelaag van zenuwen van essentieel belang voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën zodat de ziekte een langzamer verloop of een mildere vorm krijgt. Daarnaast kan de verkregen kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals ALS, MS en de ziekte van Parkinson. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

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 vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
 - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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
AVD116002017890

Bijlagen

2

Datum 8 augustus 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 augustus 2017. Het gaat om uw project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002017890. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

8 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017890

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 27366422
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2
Postbus: 9600
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN
IBAN: NLIIDEUT0451001400
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: NLIIDEUT0451001400

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
8 augustus 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2018
Geplande einddatum: 31 december 2022
Titel project: Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.
Titel niet-technische samenvatting: De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth
Naam DEC: Secretariaat DEC LUMC
Postadres DEC: [REDACTED]
2300 RC Leiden
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
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:

Datum:



gemandateerd vergunninghouder

Leiden

6 juni 2017

Datum:

8 augustus 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017890



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden



Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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
AVD116002017890

Bijlagen

2

Datum 8 augustus 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 augustus 2017

Vervaldatum: 7 september 2017

Factuurnummer: 170890

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD116002017890	€ 1.287,00

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 24 augustus 2017 15:18
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: AVD116002017890: aanvullende informatie

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Allereerst bedankt voor de vragen in relatie tot dit project.

De aanvrager heeft in afstemming met de [REDACTED] (Instantie voor Dierenwelzijn) de antwoorden geformuleerd. De antwoorden zijn zojuist via de portal ingediend.

Het betreft het volgende bestand:

- AVD116002017890_antwoord op vragen van de CCD

Ik ga ervan uit dat dit bestand via de portal goed is aangekomen. Zou dit niet het geval zijn, dan horen we dat uiteraard graag.

Met vriendelijk groet,

[REDACTED]
 Secretaris Instantie voor Dierenwelzijn
 Leids Universitair Medisch Centrum / Universiteit Leiden

[REDACTED] Postbus 9600, 2300 RC Leiden

[REDACTED]
 Instantie voor Dierenwelzijn: [REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: woensdag 23 augustus 2017 10:09

To: Projectvergunningen Wet op de dierproeven (BEHDIV5)

Cc: [REDACTED]

Subject: AVD116002017890: aanvullende informatie

Geachte mevrouw [REDACTED]

Op 8 augustus 2017 hebben wij een aanvraag van u ontvangen met aanvraagnummer AVD116002017890. Wij hebben nog een aantal vragen over uw aanvraag.

- U gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Vanwege het geslacht specifieke verschil in complement levels, is het volgens u noodzakelijk mannelijke en vrouwelijke dieren in aparte proeven te testen.

Deze handelswijze leidt echter tot een verdubbeling van het aantal proefdieren. U maakt niet inzichtelijk waarom het noodzakelijk is om alle proeven met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren. Kunt u, in het kader van vermindering, aangeven of het mogelijk is te starten met een van beide geslachten, terwijl alleen de belangrijkste uitkomsten in het andere geslacht worden geverifieerd?

- De functionele testen worden in de aanvraag geclassificeerd als licht ongerief. Aangezien de dieren de prikkels bij een aantal van deze testen niet kunnen ontlopen, is licht ongerief wellicht een onderschatting van het ongerief. Om

het ongerief van de functionele testen goed te kunnen inschatten, is meer informatie nodig over de frequentie van de testen en de tijd tussen de testen. U wordt verzocht dit toe te lichten.

Opsturen binnen veertien dagen

De CCD zou uw aanvraag graag tijdens de eerstvolgende vergadering willen bespreken. Indien mogelijk ontvangen wij uw reactie daarom graag uiterlijk donderdag 24 augustus. Mocht dit niet mogelijk zijn, u heeft veertien dagen de tijd om de informatie aan te leveren. U kunt dit aanleveren via NetFTP of e-mail.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]
 Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: Info-zbo

Verzonden: dinsdag 8 augustus 2017 15:19

Aan: 'PDC-LUMC-projectvergunning@lumc.nl'

CC: [REDACTED]

Onderwerp: OntvangstBevestiging 890

Geachte [REDACTED],

Deze brief is ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl

.....

Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag

.....

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

Beste collega's van de CCD,

Hierbij de antwoorden op uw vragen.

- U gebruikt zowel mannelijke als vrouwelijke dieren. Vanwege het geslacht specifieke verschil in complement levels, is het volgens u noodzakelijk mannelijke en vrouwelijke dieren in aparte proeven te testen.

Deze handelswijze leidt echter tot een verdubbeling van het aantal proefdieren. U maakt niet inzichtelijk waarom het noodzakelijk is om alle proeven met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uit te voeren. Kunt u, in het kader van vermindering, aangeven of het mogelijk is te starten met een van beide geslachten, terwijl alleen de belangrijkste uitkomsten in het andere geslacht worden geverifieerd?

Wij nemen het advies van de CCD over. Het is inderdaad onze strategie om eerst in het ene en dan in het andere geslacht te kijken als de eerste experimenten hier aanleiding toe geven. Er is een groot verschil in MAC niveaus tussen mannen en vrouwen. Muizen mannetjes hebben tot wel 10x (stamafhankelijk) zoveel MAC in vergelijking met vrouwen. Ook bij mensen zijn er grote verschillen in complement activiteit. Echter wij zijn het met de CCD eens dat we proeven eerst uitvoeren bij 1 geslacht en dan in een later stadium (in samenspraak met de IvD en deskundigen in het veld) bepalen welke proeven herhaald moeten worden in het andere geslacht. Wij vragen aan de CCD of dit op "werkprotocol niveau" kan worden bepaald.

- De functionele testen worden in de aanvraag geclassificeerd als licht ongerief. Aangezien de dieren de prikkels bij een aantal van deze testen niet kunnen ontlopen, is licht ongerief wellicht een onderschatting van het ongerief. Om het ongerief van de functionele testen goed te kunnen inschatten, is meer informatie nodig over de frequentie van de testen en de tijd tussen de testen. U wordt verzocht dit toe te lichten.

Informatie over functionele testen in bijlage 1: We volgen de motorische functies van de dieren met standaard functionele testen. Dit kunnen zijn: grip strength, neurological score, balance beam, rotarod, phenotyper kooi en hanging wire. Dit doen we om het verloop van de ziekte te volgen tot maximaal 18 weken en het effect van de behandeling met complement remmers te zien. De testen worden om de 3 weken herhaald vanaf week 4. Dus bijvoorbeeld voeren we de testen uit in week 4, 7, 10, 13, 16. Die testen worden zoveel mogelijk op 1 dag gedaan die week. De meeste testen duren een paar minuten per dier. Dus na die dag van testjes hebben de dieren weer 3 weken "vrij".

Bij iedere hierboven beschreven test wordt het dier niet geforceerd een bepaald gedrag te vertonen. Het iedere test afzonderlijk geeft ongerief dat vergelijkbaar is met het ongerief van een open veld. Door de herhaling van de testen hebben we in lijn met het document op uw website ('notitie wat is een dierproef') het cumulatieve ongerief van de gedragstesten ingeschat als bovendrempelig en derhalve als licht ongerief. Het totale cumulatieve ongerief van de hele proef is voor de dieren matig.

Informatie over functionele testen in bijlage 2: Het betreft een sensorische test die het functieherstel van sensorische zenuwen meet. De test wordt meestal 3 a 4 x per week gedaan gedurende 2 weken. De test zelf duurt ongeveer 1 minuut per dier.

Hierbij wordt wel degelijk een pijn prikkel toegediend, maar het dier kan op het moment dat het dier het zelf wil zijn poot terugtrekken. Doordat de pijn prikkel langzaam opgevoerd wordt, zal het dier zelf kunnen aangeven wat hij wel of niet tolereert. Wij hebben deze test ingeschat als meer ongerief dan een open veld. Daarom hebben we deze test afzonderlijk ingeschat als licht ongerief. We hopen dat deze informatie meer duidelijkheid verstrekt om het ongerief in te schatten. Wij schatten het cumulatieve ongerief door de herhaling van de testen in als maximaal licht ongerief, het totale cumulatieve ongerief is voor de dieren matig.

Met vriendelijke groet

■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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

AVD116002017890

Bijlagen

1

Datum 11 september 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 8 augustus 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem." met aanvraagnummer AVD116002017890. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 augustus 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op 23 augustus 2017 hebben wij u vragen gesteld over het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren en de functionele testen. Wij kunnen ons vinden in uw antwoord.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie Secretariaat DEC LUMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 juni 2017. Bij

de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Datum:

11 september 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017890

Bezwaar

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen.

Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
11 september 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017890



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem." met aanvraagnummer AVD116002017890, volgens advies van Dierexperimentencommissie Secretariaat DEC LUMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar, Hoofd van het LDGA.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 8 augustus 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 augustus 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 augustus 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2017, ontvangen op 8 augustus 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 augustus 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. C3 pmp22 model en de invloed van c-Jun expressie in de aan en afwezigheid van complement remmers				
	Muizen (Mus musculus) /	432	100% Matig	
3.4.4.2. Zenuw crush model in wildtype en c-Jun knockout dieren; effect van complement remmers				
	Muizen (Mus musculus) /	480	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD116002017890

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:

AVD116002017890

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:

AVD116002017890

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.

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017890
2. Titel van het project: Identificatie van c-Jun afhankelijke moleculaire routes tijdens regeneratie van zenuwen en de rol van het complement systeem.
3. Titel van de NTS: De oorzaak van zenuwschade bij de ziekte van Charcot Marie Tooth.
4. Type aanvraag:
 - ☒ nieuwe aanvraag projectvergunning
 - ☐ wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ☒ ontvangen door DEC: 12-04-2017
 - ☒ aanvraag compleet: 12-04-2017
 - ☒ in vergadering besproken: 04-05-2017
 - ☐ anderszins behandeld:
 - ☒ termijnonderbreking(en) 26-05-2017 t/m 30-05-2017
 - ☐ besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermin met maximaal 15 werkdagen
 - ☒ aanpassing aanvraag: 30-05-2017
 - ☒ advies aan CCD: 01-06-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD
8. Eventueel horen van aanvrager
N.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: 26-05-2017
 - Strekking van de gestelde vragen:

De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de meerwaarde van RNAseq, de noodzaak van 2 modellen, het maatschappelijke belang, het verwijderen van de minipompjes, het ongerief, het gebruik van zowel mannelijke als vrouwelijke dieren, de verfijning en de humane eindpunten.
 - Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlages en de NTS naar tevredenheid door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De aanvraag komt overeen met voorbeeld 4B uit de handreiking 'Wat is een project': Het onderzoek bestaat uit drie onderdelen die samen een goed beeld geven van de moleculaire processen tijdens demyelinisatie en de rol van c-Jun en het complement system. De proeven zijn qua uitvoering onafhankelijk van elkaar, maar de resultaten van onderdelen 1 en 2 kunnen gebruikt worden om biomarkers te definiëren die getest kunnen worden tijdens onderdeel 3. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit project is tweeledig:
 - a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaag mogelijk maken.
 - b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.Het uiteindelijke doel is om inzicht te krijgen hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en wat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat remming van het complement systeem demyelinisatie vertraagt en herstel van de zenuw kan versnellen. Het is echter niet bekend welke moleculaire routes betrokken zijn bij het proces van demyelinisatie en remyelinisatie. De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd zijn de proefdieren, de onderzoekers

en de patiënt en diens naasten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De wetenschappers zullen kennis verkrijgen over de moleculaire processen die een rol spelen bij demyelinisatie. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de wetenschappers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor de patiënten bevorderd worden: de verkregen kennis zou een eerste stap kunnen zijn om in de toekomst therapieën te ontwikkelen die de ziekte kunnen sturen richting een langzamer verloop of mildere vorm. Hierdoor belanden minder patiënten in een rolstoel en zouden zij met geringe beperkingen een volwaardig leven kunnen hebben. Daarnaast kan de verkregen wetenschappelijke kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals bij ALS, MS en de ziekte van Parkinson.

6. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. Het project bouwt verder op langlopend onderzoek dat wordt uitgevoerd door de onderzoeksgroep. De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van dierexperimenteel onderzoek met betrekking tot neurodegeneratieve ziekten en diermodellen van deze ziekten. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijke resultaten behaald. Daarnaast zijn er subsidies voor dit onderzoek binnen gehaald.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van een afwijkende locatie en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwefdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie, analgesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De DEC schat dat de dieren als gevolg van de zenuw crush matig ongerief ondervinden. Van het fenotype, het plaatsen en vervangen van

de minipomp onder anesthesie en de functionele testen ondervinden de muizen gering ongerief. Naar inziens van de DEC zullen alle dieren echter cumulatief matig ongerief ondervinden. Deze inschatting is in overeenstemming met het niveau van het cumulatief ongerief ingeschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van dieren wordt fysiek aangetast doordat de dieren genetisch gemodificeerd zijn. Tevens zal een groot aantal dieren een operatie ondergaan waarbij er een minipomp subcutaan geplaatst wordt. De integriteit zal ook gedragsmatig worden aangetast. Gedurende het project worden de dieren namelijk beperkt in hun bewegingsvrijheid. Hierdoor zullen de dieren minder natuurlijk gedrag kunnen vertonen.
13. Naar mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van de incidentie met betrekking tot het bereiken van een humaan eindpunt eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diersmodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diersmodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende diersproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Muizen hebben een aangeboren immuun systeem vergelijkbaar met de mens. Daarnaast herstellen muizen sneller dan bijvoorbeeld ratten. Hierdoor is het makkelijker om binnen afzienbare tijd effecten te zien van behandelingen op herstelsnelheid. Het gekozen muismodel brengt 3 tot 4 kopieën van het CMT1A gen tot expressie wat resulteert in een fenotype dat erg lijkt op de ziekte CMT1A in de mens. In deze muizen is er net als in de mens sprake van demyelinisatie, een spontane langzame afbraak van de myelinelaag die in eerste instantie wel volledig is gevormd. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van intacte dieren om de doelstelling van dit project te realiseren. Myelinisatie is in vitro zeer moeilijk te reproduceren en niet mogelijk in combinatie met immuun cellen.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van diersproeven. Zo heeft elk dier in het zenuwcrush model zijn eigen interne controle waardoor er geen extra controle groepen nodig zijn. Naar inzien van de DEC is de strategie helder en eenduidig omschreven, waardoor er geen onnodig onderzoek zal worden uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van diersproeven en is zo opgezet dat de diersproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door het gebruik van adequate anesthesie en analgesie waar nodig. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven diersproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project mannelijke als vrouwelijke dieren in gelijke mate gebruiken. De onderzoeker heeft dit naar mening van de DEC voldoende onderbouwd in de projectaanvraag.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood. De zenuwen worden geïsoleerd voor verdere analyse. Dit is van essentieel belang om de experimenten goed te beoordelen en is niet mogelijk zonder het dier te doden. Het doden van de dieren gebeurt volgens een voor de diersoort passende dodingsmethode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het directe doel, te weten:
 - a) Identificatie van de moleculaire routes (of factoren) in Schwann cellen die worden geactiveerd door c-Jun en die degeneratie en regeneratie van de myelinelaa mogelijk maken.
 - b) Bepalen wat de bijdrage is van deze factoren bij het ontstaan van Charcot Marie Tooth (CMT) in muizen bij aan- en afwezigheid van complement remming.Met als uiteindelijke doel het verkrijgen van meer inzicht over hoe op moleculair niveau demyelinisatie in CMT verloopt en om met deze kennis nieuwe inzichten te verwerven voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op het verkrijgen van nieuwe inzichten over hoe demyelinisatie kan worden geremd en hoe het zenuwherstel mogelijk kan worden gestimuleerd.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de patiënten (incl. de samenleving) bevorderd worden: groot voordeel.

De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren.

De ziekte van Charcot Marie Tooth (CMT) is een hereditaire motorische en sensorische neuropathie in het perifere zenuwstelsel die resulteert in verlammingen en sensorische storingen bij patiënten. CMT komt bij zeker één op de tienduizend mensen voor. De ernst van het klinische beeld is echter zeer divers. Sommige patiënten komen al op jonge leeftijd in een rolstoel terecht terwijl anderen met dezelfde aandoening op hoge leeftijd alleen meer moeite hebben met lopen of vaker struikelen. Er is op dit moment geen behandeling beschikbaar voor CMT. De DEC acht het verkrijgen van meer inzicht in welke processen een rol spelen bij de afbraak van de myelinelaa van zenuwen van essentieel belang voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën zodat de ziekte een langzamer verloop of een mildere vorm krijgt. Daarnaast kan de verkregen kennis niet alleen van toepassing zijn bij CMT maar mogelijk ook bij andere zenuwziekten waarbij sprake is van demyelinisatie, zoals ALS, MS en de ziekte van Parkinson. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief bij de dieren gerechtvaardigd.

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 vergunning plichtig is om de volgende redenen:...
 - ☐ De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - ☐ De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.