



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 in de 'Toelichting op de te gebruiken formulieren voor de aanvraag van een projectvergunning' op de website www.centralecommissiedierproeven.nl
- Of neem telefonisch contact op (0800-789 0789).

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	50100	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek (TNO)	
1.3	Vul het volgnummer en de titel van de dierproef in.	Volgnummer	Titel dierproef
		1	E3L en E3L.CETP fok

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.3 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De APOE*3-Leiden (E3L) en de APOE*3-Leiden.CETP (E3L.CETP) muizen zijn noodzakelijk voor de projecten binnen TNO en in het bijzonder voor AVD50100202317240 (muscle loss) en AVD50100202216407 (metabolic health).

Deze dieren worden binnen TNO gefokt als heterozygote E3L x wildtype muis om de E3L dieren te genereren en als heterozygote E3L x homozygote CETP muis om de E3L.CETP dieren te genereren. Dit omdat homozygote E3L al *in utero* sterft. De fok met de heterozygote E3L dieren voorkomt deze sterfte in de baarmoeder. De dieren hebben gezonde nakomelingen en deze kunnen in open kooien gehuisvest worden zonder dat ze ongerief (in vergelijking met wildtype dieren) ontwikkelen.

Op grond van de handreiking voor het 'genereren, fokken, genotyperen, monitoren en houden van genetisch gewijzigde dieren' waarin beschreven staat dat een projectvergunning vereist is voor de fok waarbij door heterozygoten x heterozygoten of heterozygoten x wild-type worden gekruist om het risico op de expressie van een pathologisch fenotype te verminderen of te elimineren.

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

De fok van de heterozygote E3L x wildtype dieren wordt gebruikt voor het in stand houden van de E3L fok, voor het kruisen met de homozygote CETP dieren en voor de uitvoering van (reeds vergunde) projecten.

E3L fok:

E3L/WT x WT/WT → E3L/WT en WT/WT

De heterozygote E3L x homozygote CETP fok wordt gebruikt om E3L.CETP dieren te verkrijgen voor de uitvoering van (reeds vergunde) projecten.
De dieren worden geormerkt voor identificatie en voor het genotyperen. Incidenteel kan het voorkomen dat de dieren een extra oormerk krijgen, bijvoorbeeld als de genotypering is mislukt.

E3L.CETP fok:

E3L/WT x hCETP/hCETP → E3L/hCETP en WT/hCETP

De nakomelingen zonder het E3L gen zullen voor de speenleeftijd worden gedood tenzij ze kunnen worden ingezet als 'surplus' dieren in andere experimenten.

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

Voor de huidige projectaanvragen AVD50100202317240 (muscle loss) en AVD50100202216407 (metabolic health) zijn er in het totaal $1000 + 10.000 = 11.000$ dieren aangevraagd. De schatting is dat 50% van deze studies zal worden uitgevoerd met de E3L of E3L.CETP dieren. Dat zijn dan 5500 dieren in vijf jaar oftewel 1100 dieren per jaar.

Alleen vrouwelijke E3L of E3L.CETP dieren ontwikkelen artherosclerose wanneer ze op een Westers-type dieet staan.

Daarom moeten er 2x zoveel dieren gefokt worden

Door de heterozygoot x wildtype of heterozygote x homozygote CETP fok heeft slechts 50% van de dieren het goede fenotype. Daarom moeten er nog een keer 2x zoveel dieren gefokt worden.

Dit zou dus neerkomen op $1100 \times 2 \times 2 = 4400$ dieren per jaar $\times 5$ jaar = 22000 dieren (NB. Dit is het aantal inclusief wildtype nakomelingen).

Deze schatting komt redelijk overeen met de aantallen dieren die die in de voorgaande jaren zijn gefokt (zie tabel)

	2023	2022	2021	2020	2019
E3L	1122	2372	1067	1805	1718
E3L.CETP	1576	3428	4453	4149	5373

Deze vergunningsaanvraag geldt alleen voor de genetisch gemodificeerde dieren die gebruikt worden in de fok en die als fokoverschot overblijven (dat wil zeggen: dieren die niet gebruikt worden in een studie vallend onder een andere vergunning). Het aangevraagde aantal dieren is hierdoor **12094**. Hieronder wordt de berekening voor dit aantal dieren uitgelegd:

Benodigd aantal dieren = 22000

Voor de E3L fok worden jaarlijks in de kernfok 40 E3L mannen en 80 wildtype vrouwen ingezet. De productiefok is 'op aanvraag'. Gemiddeld over de laatste vijf jaar komt dit overeen met circa 50 E3L mannen en 100 wildtype vrouwen per jaar. Gecombineerd geeft dit dus voor E3L fok over de vijfjaarsperiode: 450 E3L mannen en 900 wildtype vrouwen benodigd voor de fok (totaal **1350**).

Voor de E3L.CETP fok is er geen kernfok, hierin wordt alleen 'op aanvraag' gefokt. Hierbij wordt geprobeerd om zoveel mogelijk gebruik te maken van beide geslachten. Gemiddeld over de laatste 5 jaar kwam dit overeen met circa 50 CETP mannen met 100 E3L vrouwen en 50 CETP vrouwen met 25 E3L mannen die per jaar werden ingezet.

Over de vijfjaarsperiode zijn er dan 375 CETP mannen en 750 E3L vrouwen nodig voor de fok (totaal **1125**).

In het totaal zijn het dan $1350+1125=2475$ dieren waarvan 900 wildtype dieren.

Genetisch gemodificeerde dieren in de fokparen: $2475-900 \text{ WT} = 1575$

Dieren naar experiment=5500

Surplus = $22000 [\text{totaal}] - 5500 [\text{naar experiment}] - 2475 [\text{fokparen}] = 14025$, waarvan circa 25% WT (50% voor de E3L fok en 0% uit de E3L.CETP fok. Deze 25% is als van beide fokken evenveel dieren worden ingezet. In de praktijk zullen er meer E3L dieren gefokt worden dus relatief meer wildtype dieren (zonder ongerief)

Hieruit volgt dat het fokoverschot van genetisch gemodificeerde dieren maximaal $0.75 \times 14025 = 10519$ zal bedragen.

De vergunningsaanvraag Totaal (fok + fokoverschot) zonder WT = $1575 + 10519 = 12094$

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, levensstadia, geschatte aantallen per levensstadium, geslacht, genetische wijzigingen en, indien van belang voor het behalen van de doelstelling, de te gebruiken stam.

Volgnr.	Diersoort	Herkomst	Levensstadium	Aantal	Geslacht	Genetisch gewijzigd	Stam
1	Muis	Eigen fok of commercieel fokbedrijf (voor wildtype dieren)	0 tot 1 jaar	12094	Mannen en vrouwen	Ja (en wiltype dieren)	ApoE*3Leiden, ApoE*3Leiden.CE TP, C57Bl/6

Onderbouw de bovengenoemde keuzes.

Diersoort	Muis
Herkomst	Deze stammen zijn niet commercieel verkrijgbaar
Levensstadia	Voor de fok worden geen dieren ouder dan 9 maanden ingezet. Binnen TNO wordt als vuistregel aangehouden dat voor een fok geen dieren ouder dan 9 maanden worden gebruikt, omdat in onze ervaring vanaf die leeftijd er een toenemende kans bestaat dat er kleinere nestjes geboren worden dan bij jongere dieren. Bij het inzetten van een fok om dieren te genereren voor een studie, proberen we dan ook het aantal fokpaartjes te gebruiken wat ons op basis van de gemiddelde nestgrootte (ongeveer 8 dieren) het benodigde aantal dieren voor de proef oplevert. Afwijkingen van de nestgrootte willen we daarbij voorkomen om voldoende dieren te genereren zonder een onnodig overschot te creëren.
Aantal	Aantallen zijn nodig om de projecten te kunnen uitvoeren. Voor de E3L en E3L.CETP fok genereren we per kruising 50% heterozygote E3L of E3L.CETP dieren en 50% WT of heterozygote hCETP dieren (n.b. homozygote E3L dieren zijn niet levensvatbaar). Dat betekent dat 50% van de fok gebruikt kan worden in experimenten.
Geslacht	Zowel mannen als vrouwen zijn nodig voor de fok
Genetisch gewijzigd	Door hun genetische aanpassing zijn deze stammen zijn ook geschikt voor o.a. obesitas en diabetes onderzoek, maar alleen na dietaire inductie
Stam	

C. Huisvesting en verzorging

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

☒ Ja

☐ Nee > 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.

D. Pijn en welzijnsaantasting

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

☒ Nee >

☐ 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.

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Niet van toepassing

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing

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

Niet van toepassing

E. 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 F.

☐ Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

F. Classificatie van ongerief

Benoem de experiment gebonden factoren die bijdragen aan het ongerief en geef voor elk van deze factoren aan hoe het ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig'. Geef per diersoort en behandelgroep het cumulatieve ongerief aan in percentages van het totale aantal dieren.

De genetische afwijkingen zorgen niet spontaan voor ongerief.

Los van het exacte aantal handelingen is het cumulatieve ongerief nooit nul, maar zal ook niet ernstiger zijn dan licht ongerief. Deze bewering geldt voor alle genotypes, en alle leeftijden.

G. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging	Voor het fokken van dieren zijn geen alternatieven beschikbaar
------------	--

Vermindering	Door de gebruikte fokstrategie (zie projectvoorstel) worden er zo weinig mogelijk dieren gefokt
Verfijning	In de dierfaciliteiten wordt er gebruik gemaakt van 'buisshantering' waardoor de stress ten gevolge van het hanteren wordt geminimaliseerd. Door het inzetten van de fok met heterozygote x wildtype E3Leiden dieren wordt voorkomen dat er homozygoot dieren (met mogelijk ongerief) worden geboren.
Zijn er nadelige milieueffecten te verwachten?	
☒ Nee ☐ Ja > Benoem de te verwachten milieueffecten en geef aan welke maatregelen zijn genomen om deze tot een minimum te beperken.	

H. Hergebruik

Worden er dieren ingezet die eerder in een andere dierproef zijn gebruikt?
☒ Nee, ga verder met vraag I. ☐ 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 op) ernstig ongerief?
☐ Nee ☐ Ja > Geef aan op basis van welke overwegingen hergebruik in dit geval acceptabel wordt geacht.

I. Herhaling

Geef voor wettelijk vereist onderzoek aan hoe is nagegaan of deze dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. Indien van toepassing, geef aan waarom duplicatie noodzakelijk is.
Niet van toepassing

J. Plaats waar de dierproef wordt uitgevoerd

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 K. ☐ 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?

K. Bestemming van de dieren bij einde experiment

Worden de dieren gedood?
☒ Nee > Beschrijf de bestemming van de dieren. ☐ Ja > Geef aan waarom de dieren worden gedood.
Fokouders, surplus dieren en dieren met het niet gewenste genotype worden gedood.

Indien dieren worden gedood, wordt er een methode(n) van doden uit bijlage IV van Richtlijn 2010/63/EU toegepast?

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

☒ Ja > Betreft het een dodingsmethode die alleen onder specifieke voorwaarden mag worden toegepast?

☒ Nee> Beschrijf de dodingsmethode

Verstikking door geleidelijke CO2 verhoging of door cervicale dislocatie.

☐ Ja > Beschrijf de dodingsmethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Indien dieren worden gedood, maar niet in het kader van de proef, geef aan of herplaatsing is overwogen en waarom hiervan is afgezien.

Het zijn transgene dieren, daardoor zijn deze dieren niet geschikt om voor adoptie aan te bieden.