

	<b>Dossier: AVD1150020174315</b>	
		<b>Aanwezig</b>
<b>1</b>	<b>NTS</b>	<b>X</b>
<b>2</b>	<b>Aanvraagformulier</b>	<b>X</b>
<b>3</b>	<b>Projectvoorstel</b>	<b>X</b>
<b>4</b>	<b>Bijlage beschrijving dierproeven</b>	<b>5x</b>
<b>5</b>	<b>DEC-advies</b>	<b>X</b>
<b>6</b>	<b>Ontvangstbevestiging</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. Vragen CCD aan aanvrager</b>	<b>X</b>
	<b>Evt. antwoorden aanvrager</b>	
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>x</b>



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Titel van het project	Bescherming en herstel van de gehoorzenuw bij doofheid.
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Doofheid, binnenoorimplantaat, gehoorzenuw, zenuwherstel, elektrische stimulatie

### 2 Categorie van het project

2.1 In welke categorie valt het project.	<input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek
	<input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek
	<input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
<i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i>	<input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid
	<input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
	<input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding
	<input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek
	<input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	<p>De meeste gevallen van doofheid worden veroorzaakt door afwezigheid van haarcellen in het binnenoor. In die gevallen kan de gehoorzenuw elektrisch gestimuleerd worden middels een binnenoorimplantaat, waardoor dove mensen weer kunnen horen. Maar na haarcelverlies treedt dikwijls na verloop van tijd aftakeling van de gehoorzenuw op, zowel structureel als functioneel. Omdat een binnenoorimplantaat de gehoorzenuw elektrisch stimuleert, is het noodzakelijk dat de gehoorzenuw goed functioneert.</p> <p>Het globale doel van dit project is het beschermen van de gehoorzenuw ten behoeve van goed functioneren van het binnenoorimplantaat. Dit willen we bereiken vanuit vier verschillende invalshoeken:</p> <p>1) Het binnenoorimplantaat bestaat gedeeltelijk uit een elektrodenbundel die voorzichtig in het fragiele binnenoor geschoven moet worden. Om de</p>
---	--

structuren in het binnenoor zo goed mogelijk te behouden willen we de implantatieprocedure verbeteren.

2) Gezonde haarcellen produceren groeifactoren, die de gehoorzenuw het signaal geven te blijven leven. Bij doofheid door haarcelverlies is dit overlevingssignaal verdwenen. Door toediening van deze groeifactoren in dove dieren kunnen we onderzoeken of de zenuw intact blijft.

3) Om geluiden via het implantaat aan de gehoorzenuw door te geven, wordt de zenuw continu elektrisch gestimuleerd. We willen onderzoeken of deze continue elektrische stimulatie op de lange termijn negatieve of juist positieve effecten heeft op de gezondheid van de gehoorzenuw.

4) De geleidelijke aftakeling van de gehoorzenuw is in principe onomkeerbaar. We willen met stamcellen de gedeeltelijk afgestorven gehoorzenuw weer aanvullen met nieuwe zenuwcellen.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?

Mensen met ernstig gehoorverlies zijn vaker arbeidsongeschikt, en dreigen zelfs in een sociaal isolement te raken. Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie kan een goed werkend binnenoorimplantaat daardoor zowel economisch als sociaal een belangrijke bijdrage leveren.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Maximaal 596 cavia's.

3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?

- de meeste dieren moeten worden doofgemaakt om de menselijke situatie na te bootsen;
- pijn in de eerste dagen na operaties;
- mogelijk onaangename gehoorsensatie door elektrische stimulatie;
- problemen met evenwicht als gevolg van implantatie.

3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?

1% van de dieren: licht ongerief; de rest: matig ongerief.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden na afloop gedood omdat het weefsel van het binnenoor geanalyseerd moet worden.

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**  
Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.

Het is noodzakelijk om een compleet functionerend gehoororgaan te hebben, waarbij specifiek de effecten van de aftakeling van de gehoorzenuw gevolgd kunnen worden die ontstaan bij doofheid.

4.2 **Vermindering**  
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo

Door herhaalde metingen in dezelfde cavia's met een permanent binnenoorimplantaat kan op meerdere tijdstippen de functionele staat van de gehoorzenuw bepaald worden. Hierdoor kunnen we met een enkele cavia

gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

dezelfde hoeveelheid informatie verkrijgen als met meerdere cavia's met een tijdelijk geïmplanteerde elektrodenbundel.

Als positieve controles voor alle behandelingen zullen resultaten uit voorgaande studies met normaalhorende cavia's gebruikt worden; als negatieve controles kunnen we de linkeroren gebruiken, omdat we alleen de rechteroren behandelen.

#### 4.3 Verfijning

Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersoort(en) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

De cavia wordt internationaal veel in gehooronderzoek gebruikt omdat het gehoor van de cavia vergelijkbaar is met dat van de mens, en relatief eenvoudig te benaderen is. Daar komt nog bij dat onze groep grote ervaring heeft met de cavia als proefdier voor binnenoorkonderzoek.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

1) Operaties worden onder volledige verdoving en adequate pijnstilling uitgevoerd.

2) De stroomsterkte van de elektrische stimulatie zal per dier apart bepaald worden, zodat deze stimulatie zo verdraagzaam mogelijk zal zijn.

3) De cavia's zullen de apparatuur die nodig is voor de elektrische stimulatie bij zich dragen, zodat ze vrij kunnen bewegen in hun kooi. Daarom hoeven ze tijdens de stimulatieperiode niet apart gezet te worden.

4) Dieren worden dagelijks bekeken; bij verschijnselen die wijzen op ernstig ongerief, worden de dieren gedood.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



## Centrale Commissie Dierproeven

## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11500
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	30244197
		Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	onderzoeker
		Afdeling	Keel-, Neus-, en Oorheelkunde
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	onderzoeker
		Afdeling	Keel-, Neus-, en Oorheelkunde
		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.
- |                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |
| Afdeling                    |  |
| Telefoonnummer              |  |
| E-mailadres                 |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2018  |
| Einddatum  | 31 - 1 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bescherming en herstel van de gehoorzenuw bij doofheid.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1827 [5 bijlagen] **Lege**  
 Wijziging € **Lege**
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:

- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht

04-12-2017



## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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



opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Volgens een schatting van de Wereldgezondheidsorganisatie lijdt meer dan 5% van de wereldbevolking aan significant beperkend gehoorverlies ([www.who.int](http://www.who.int); februari 2017). De etiologie varieert behoorlijk (genetisch disfunctioneren, infectie, lawaaitrauma, ouderdomsdoofheid, ototoxiciteit door antibiotica of chemotherapie), maar deze oorzaken hebben gemeen dat het probleem veelal bij de auditieve periferie (i.e., de cochlea) ligt. Binnen de cochlea is in al deze gevallen de afwezigheid, vernietiging of disfunctioneren van haarcellen veruit de meest voorkomende oorzaak van het gehoorverlies. Waar bij beperkt verlies van haarcellen conventionele hoortoestellen een uitkomst kunnen bieden, is bij substantieel tot volledig haarcelverlies cochleaire implantatie de enige behandelmethode op dit moment. Cochleaire implantatie houdt in dat een elektrodenbundel in de spiraliserende scala tympani van de cochlea wordt aangebracht, via welke de ganglioncellen die de gehoorzenuw vormen elektrisch gestimuleerd worden. Geluid omgezet in elektrische pulsen en aangeboden aan deze spirale ganglioncellen (SGC's) kan zo door dove mensen weer geïnterpreteerd worden.

Vele doven en slechthorenden zijn gebaat bij deze techniek, en het is voor deze mensen vaak mogelijk om te telefoneren (gesprek voeren zonder visuele hulp), maar een substantiële groep ervaart slecht weinig of geen profijt van het implantaat. Bijvoorbeeld: een overzichtsstudie heeft laten zien dat het verstaan van zinnen voor 55 mensen met een CI gemiddeld maar liefst 90% was; maar waar 44 patiënten tussen 90% en 100% scoorden, waren er 11 die redelijk egaal verspreid tussen 20% en 90% scoorden (Wilson en Dorman, 2008). Het is veelal onduidelijk wat aan deze variabiliteit ten grondslag ligt; daarom is het van belang om naast klinisch gericht onderzoek – zoals het verbeteren van de kwaliteit van het horen met een cochleair implantaat – tevens de neurobiologie van doofheid te onderzoeken om zo ook degenen die amper gebaat zijn bij cochleaire implantatie verbetering te kunnen bieden.

Bovenstaande globale schets van de huidige situatie aangaande doofheid (en ernstige slechthorendheid) – en de oorzaken en beschikbare therapieën hiervoor – impliceert meerdere aanknopingspunten voor onderzoek ten behoeve van vergroting van kennis en kunde met het uiteindelijke doel het gehoor van doven en slechthorenden met een cochleair implantaat te verbeteren. Samengevat willen we met deze aanvraag de resterende populatie SGC's behouden en beschermen tegen degeneratie door middel van (1) atraumatische insertie van de elektrodenbundel en (2) farmacologische interventie; daarnaast willen we (3) de mogelijk positieve effecten van chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw zowel structureel als functioneel in kaart brengen, en tot slot (4) middels stamceltherapie de gehoorzenuw herstellen door de geslonken SGC-populatie aan te vullen. Puntsgewijs volgt hieronder specifiekere achtergrond:

#### 1) beperking van trauma door insertie van de elektrodenbundel

Het inbrengen van de elektrodenbundel in de cochlea kan leiden tot acute mechanische schade aan zowel de benige als de membraneuze structuren. Dergelijke insertieschade kan leiden tot gedeeltelijk of volledig verlies van eventueel akoestisch restgehoor (enig laagfrequent gehoor is vaak nog aanwezig). Daarbij kan het leiden tot excessieve fibrose- of zelfs botgroei, waardoor elektrische stimulatie van de gehoorzenuw minder effectief wordt (Kamakura en Nadol, 2016). Minimaal-traumatische implantatie is om deze reden van groot belang.

#### 2) Neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw

Haarcelverlies leidt direct tot gehoorverlies, maar heeft secundair tot gevolg dat de gehoorzenuw gaandeweg afsterft (Versnel et al., 2007). In een natuurlijke situatie heeft die secundaire degeneratie geen verdere gevolgen, maar een cochleair implantaat is volledig afhankelijk van de zenuw – juist bij afwezigheid van de haarcellen. Er wordt algemeen aangenomen dat de SGC's die de gehoorzenuw vormen degenereren door het verlies aan neurotrofe ondersteuning vanuit de haarcellen; behandeling met neurotrofe factoren na inductie van haarcelverlies leidt dan ook tot behoud van de SGC's (Ramekers et al., 2012). De experimentele methoden die tot op heden gebruikt zijn om neurotrofe factoren toe te

dieren in diermodellen zijn echter niet klinisch toepasbaar; we onderzoeken daarom eenvoudigere en minder invasieve methoden die niet (te veel) aan effectiviteit inboeten. Inmiddels hebben we een dergelijke methode ontwikkeld (Havenith et al., 2011, 2015), maar moet de effectiviteit hiervan nog onderzocht worden. Geschikte methoden om dit te onderzoeken hebben we inmiddels ontwikkeld en meerdere malen toegepast (Ramekers et al., 2014, 2015a, 2015b).

Een deel van deze studie is inmiddels uitgevoerd, en de positieve voorlopige resultaten hebben ertoe geleid dat we met deze aanvraag de studie willen uitbreiden tot een volwaardig vierjaars promotietraject. Voorlopige resultaten laten zien dat de neurotrofe factor BDNF basaal in de cochlea celbehoud biedt, en dat daarbij ook functioneel behoud te zien is. De resultaten met de neurotrofe factor NT-3 zijn nog niet uitgewerkt, al lijkt ook hierbij basaal goede bescherming te zijn. De behandeling met de small-molecule THF lijkt verrassend genoeg een kleiner beschermend effect te geven dan BDNF. Mede vanwege dit laatste resultaat willen we deze studie uitbreiden, door de farmacokinetiek van de verschillende neurotrofe stoffen in de cochlea en daarbuiten te onderzoeken. Deze lopende studie zal bij goedkeuring van dit project doorgaan onder de nieuwe vergunning. Bij overlap zullen de dieren die nog beschikbaar zijn onder de huidige (oude) vergunning niet meer gebruikt worden.

3) effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw

Naast de acute schade die kan optreden bij de insertie van de elektrodenbundel, kan de aanwezigheid van de elektrodenbundel over tijd een effect hebben op het functioneren van en het horen met een cochleair implantaat. In het bijzonder is het grotendeels onbekend of chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw – zoals dat in essentie continu plaatsvindt bij mensen met een cochleair implantaat – schadelijke neveneffecten voor structuur en functie van de zenuw kan hebben. Anderzijds is het goed mogelijk dat elektrische stimulatie juist positieve effecten heeft op de gehoorzenuw, omdat na het wegvallen van eerdergenoemde neurotrofe ondersteuning vanuit de haarcellen de opgewekte elektrische activiteit van de zenuwcellen wellicht neurotroof kan werken. Een dergelijk effect is in mensen amper te onderzoeken; een enkele studie heeft voorsnog geen eenduidige resultaten opgeleverd (Seyyedi et al., 2013). Eerdere dierstudies hebben laten zien dat chronische elektrische stimulatie op zichzelf geen significant effect heeft op degeneratie van de gehoorzenuw (e.g., Agterberg et al., 2010), maar de effecten op de functionaliteit van het restant aan zenuwcellen is tot dusver grotendeels onbekend.

Een tweede reden om chronische elektrische stimulatie te onderzoeken is omdat het mogelijk is dat het de beschermende werking van neurotrofe factoren versterkt (e.g., Shepherd et al., 2005). Dit versterkende effect zou met name van belang zijn bij klinisch toepasbare (i.e., minimaal invasieve) toedieningsmethoden, waarvan de effectiviteit wellicht minder is dan bij de methoden veelal gebruikt in dierexperimenteel onderzoek (zie ook punt 2 hierboven). Om deze reden zal de neurotrofe factor (of combinatie van neurotrofe factoren) die in dierproef 2 het beste celbehoud oplevert in deze dierproef gecombineerd worden met chronische elektrische stimulatie.

Onder de huidige vergunning (AVD11500201550) is deze studie opgezet; het technisch complexe studieontwerp is moeilijker gebleken dan vooraf gedacht, maar het is niettemin uitvoerbaar gebleken. Binnen de huidige vergunningsaanvraag willen we daarom deze studie voortzetten.

Tot nog toe is in deze studie het diermodel ontwikkeld en verfijnd, evenals de volledig implanteerbare elektrische stimulators. Een van de belangrijkste knelpunten was de complexiteit (en daarmee de duur) van de implantatieprocedures, waardoor de cavia's geregeld wel goed ontwaakten uit de narcose, maar de lange narcoseduur leidde tot problemen enkele dagen later (hoogstwaarschijnlijk het niet meer op gang komen van het spijsverteringsstelsel). De implantaten zijn inmiddels zo aangepast dat implantatie in twee stappen (2 weken uit elkaar) mogelijk is; deze aanpassing heeft ertoe geleid dat nagenoeg alle cavia's de operaties overleven. Een tweede probleem was het materiaal van de stimulators; een biocompatibele coating was nodig om excessieve zwelling tegen te gaan. Er zijn nu meerdere dieren succesvol geïmplanterd, doorgemaakt, en enkele weken elektrisch gestimuleerd. Analyse van de elektrofysiologische data heeft voorsnog geen duidelijk effect van de elektrische stimulatie laten zien, maar de histologie lijkt een redelijk celbehoud te laten zien in de gestimuleerde oren ten opzichte van de contralaterale oren.

Deze lopende studie zal bij goedkeuring van dit project doorgaan onder de nieuwe vergunning. Deze hernieuwde aanvraag bevat een verzoek om meer proefdieren, omdat zoals hierboven uiteengezet de ontwikkeling en optimalisatie van het experimentele ontwerp langer duurde en complexer was dan vooraf

ingeschat. Bij overlap zullen de dieren die nog beschikbaar zijn onder de huidige (oude) vergunning niet meer gebruikt worden.

#### 4) herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie

Zoals hierboven vermeld, degenereren SGC's door het verlies aan neurotrofe ondersteuning vanuit de haarcellen. Het aanvullen van de populatie SGC's met stamcellen zou een waardevolle additionele therapie kunnen zijn voor patiënten met een cochleair implantaat. Onlangs zijn de eerste veelbelovende studies gepubliceerd waarin aangetoond is dat stamcellen een zekere mate van herstel van het gehoor in doofgemaakte dieren kunnen bewerkstelligen (Chen et al., 2012). De stamcellen die wij willen gebruiken zijn stamcellen uit de haarfollikel *bulge* (HFBS C's). Dit is een relatief onbekend type stamcel, maar met meerdere voordelen in vergelijking met de meer gangbare mesenchymale en embryonale stamcellen, gezien toekomstige transplantaties in de mens: i) de procedure om haarfollikels te oogsten is bij de mens minimaal invasief, HFBS C's kunnen zelfs uit geplukte haren geoogst worden; ii) HFBS C's komen van origine uit de neurale lijst en zijn dan ook neurale voorlopercellen. HFBS C's zullen naar verwachting dan ook na transplantatie niet de neiging hebben om weer terug naar het oorspronkelijke celtype differentiëren, zoals mesenchymale cellen; iii) HFBS C's vormen geen tumoren *in vivo*; iv) de haarfollikel is een immuun-tolerant gebied, de HFBS C's zullen na transplantatie mogelijk geen, tot nauwelijks een afstotingsreactie veroorzaken, waardoor immunosuppressiva naar alle waarschijnlijkheid overbodig zijn. Het gebruik van HFBS C's voor stamceltherapie in het binnenoor lijkt veelbelovend te zijn, omdat deze cellen zich *in vivo* kunnen ontwikkelen tot neuronen en gliacellen en daardoor de gedegenererde SGC's uit de gehoorzenuw kunnen vervangen. Bovendien kunnen neurale stamcellen groeifactoren uitscheiden, die daardoor ook herstellend op de gedegenererde SGC's kunnen werken. In dit project willen we deze inzichten verwerven door in een *dove cavia* langdurig het effect van stamceltherapie vanuit verschillende invalshoeken te monitoren: functioneel, met behulp van elektrofysiologie, en visueel, door de stamcellen zichtbaar te maken in het binnenoor. Multimodale beeldvorming zoals MRI in combinatie met *in vivo* optische beeldvorming zijn daartoe de geëigende middelen, gevolgd door uitgebreid *post mortem* histologisch onderzoek. De HFBS C's zullen geoogst worden uit surplusmuizen (toestemming oogsten haarfollikels binnen 30 minuten na euthanasie via DEC-nummer LUMC 10172); haarfollikels komen uit de snor (de whiskerpad); per haarfollikel is de opbrengst ongeveer 10.000 cellen na 3 passages; per muis kunnen ongeveer 36 haarfollikels geoogst worden; 1 muis is dus meer dan voldoende voor 1 transplantatie. De cellen uit de haarfollikel zijn "immunologisch geprivilegieerd", dat wil zeggen dat ze niet of nauwelijks een immunologische reactie induceren en deze zelfs kunnen remmen. Dit laatste is gebleken uit een studie van Wang et al. (2016), waarin co-transplantatie van eilandjes van Langerhans met cellen uit de haarfollikel bestudeerd is (Bertolini et al., 2013). Daarnaast is aangetoond dat de *cavia* xenotransplantaties goed verdraagt, en dat muizenstamcellen langdurig kunnen overleven in het binnenoor van de *cavia* (Regala et al., 2005; Hildebrand et al., 2005). De gehele procedure van oogsten, transfectie, opkweken en beeldvorming *in vitro* en *in vivo* wordt beheerst door de afdeling KNO van het LUMC (Gho et al., 2016; Schomann et al., 2016), waarmee dit project in samenwerking zal worden uitgevoerd. In het kader van een eerdere studie heeft deze groep HFBS C's geïsoleerd uit muizen, en deze genetisch gemanipuleerd en vervolgens geïmplaneerd in muizen met hersenbeschadiging. De resultaten zijn veelbelovend en een publicatie hiervan volgt. Omdat tot recent in het LUMC enkel muizen en ratten als proefdier gebruikt mochten worden, zijn alle transductie-experimenten gericht geweest op HFBS C's van murine origine. Deze genetisch gemanipuleerde cellen (die een bioluminescent eiwit [vuurvlieggluciferase] en een fluorescent eiwit [copGFP] produceren) zijn nu goed gekarakteriseerd en worden daarom in onze experimenten gebruikt (Schomann et al., 2016). Er is om bovengenoemde reden geen ervaring met het genetisch manipuleren van HFBS C's uit de *cavia*. Inmiddels heeft een eerste pilot in *caviakadavers* uitgewezen dat de gehele procedure van kweken tot transplantatie in het binnenoor en bioluminescentie ook in het UMCU succesvol is.

#### 5) verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie

Uiteindelijk is het doel om een optimaal functioneren van de gehoorzenuw te bereiken bij CI-dragende patiënten. De bovenstaande experimenten richten zich daar – in het diersmodel – ook op. Het doel van project 5 is een logisch gevolg daarvan: het bewerkstelligen van herstel van de gehoorzenuw in een doof dier door middel van stamceltherapie, waarbij de gehoorzenuw elektrisch gestimuleerd wordt middels een CI.

Referenties (voor het gehele document):

- Agterberg MJH, Versnel H, de Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Albers FWJ, Klis SFL (2008) Morphological changes in spiral ganglion cells after intracochlear application of brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *Hear Res* 244:25-34.
- Agterberg MJH, Versnel H, de Groot JCMJ, van den Broek M, Klis SFL (2010) Chronic electrical stimulation does not prevent spiral ganglion cell degeneration in deafened guinea pigs. *Hear Res* 269:169-79.
- Agterberg MJH, Versnel H, van Dijk LM, de Groot JCMJ, Klis SFL (2009) Enhanced survival of spiral ganglion cells after cessation of treatment with brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *J Assoc Res Otolaryngol* 10:355-367.
- Bertolini M, Meyer KC, Slominski R, Kobayashi K, Ludwig RJ, Paus R (2013) The immune system of mouse vibrissae follicles: cellular composition and indications of immune privilege. *Exp Dermatol* 22:593-598.
- Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L, Eshtan SJ, Johnson SL, Kuhn S, Milo M, Thurlow JK, Andrews PW, Marcotti W, Moore HD, Rivolta MN (2012) Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors *Nature* 490:278-82.
- Gho CG, Schomann T, de Groot SC, Frijns JHM, Rivolta MN, Neumann MH, Huisman MA (2016) Isolation, expansion and neural differentiation of stem cells from human plucked hair: a further step towards autologous nerve recovery. *Cytotechnology* 68:1849-1858.
- Havenith S, Klis SFL, Versnel H, Grolman W (2013) A guinea pig model of selective severe high-frequency hearing loss. *Otol Neurotol* 34:1510-1518.
- Havenith S, Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Sedee RJ, Grolman W, Klis SFL (2011) Spiral ganglion cell survival after round window membrane application of brain-derived neurotrophic factor using gelfoam as carrier. *Hear Res* 272:168-177.
- Havenith S, Versnel H, Klis SFL, Grolman W (2015) Local delivery of brain-derived neurotrophic factor on the perforated round window membrane in guinea pigs. *Otol Neurotol* 36:705-713.
- Hernández D, Millard R, Sivakumaran P, Wong RC, Crombie DE, Hewitt AW, Liang H, Hung SS, Pébay A, Shepherd RK, Dusting GJ, Lim SY (2016) Electrical Stimulation Promotes Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int* 2016:1718041.
- Hildebrand MS, Dahl HH, Hardman J, Coleman B, Shepherd RK, de Silva MG. Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 6:341-354.
- Huisman MA, Rivolta MN (2012) Neural crest stem cells and their potential application in a therapy for deafness. *Front Biosci (Schol Ed)*. 4:121-132.
- Kamakura T, Nadol JB Jr. (2016) Correlation between word recognition score and intracochlear new bone and fibrous tissue after cochlear implantation in the human. *Hear Res* 339:132-141.
- Kroon S, Ramekers D, Smeets EM, Hendriksen FGJ, Klis SFL, Versnel H (2017) Degeneration of auditory nerve fibers in guinea pigs with severe sensorineural hearing loss. *Hear Res* 345:79-87.
- Mezzanotte L, Iljas JD, Que I, Chan A, Kaijzel E, Hoeben R, Löwik C (2017) Optimized longitudinal monitoring of stem cell grafts in mouse brain using a novel bioluminescent/near infrared fluorescent fusion reporter. *Cell Transplant*, doi: 10.3727/096368917X695407.
- Ramekers D, Versnel H, Grolman W, Klis SFL (2012) Neurotrophins and their role in the cochlea. *Hear Res* 288:19-33.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015a) Recovery characteristics of the electrically stimulated auditory nerve in deafened guinea pigs: relation to neuronal status. *Hear Res* 321:12-24.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015b) Temporary neurotrophin treatment prevents deafness-induced auditory nerve degeneration and preserves function. *J Neurosci* 35:12331-12345.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.
- Regala C, Duan M, Zou J, Salminen M, Olivius P. (2005) Xenografted fetal dorsal root ganglion, embryonic stem cell and adult neural stem cell survival following implantation into the adult vestibulocochlear nerve. *Exp Neurol* 193: 326-333.
- Schomann T, Mezzanotte L, Lourens IM, de Groot JCMJ, Frijns JHM, Huisman MA (2016) Lentiviral transduction and subsequent loading with nanoparticles do not affect cell viability and proliferation in

- hair-follicle-bulge-derived stem cells in vitro. *Contrast Media Mol Imaging* 11:550-560.
- Seyyedi M, Eddington DK, Nadol JB Jr. (2013) Effect of monopolar and bipolar electric stimulation on survival and size of human spiral ganglion cells as studied by postmortem histopathology. *Hear Res* 302:9-16.
- Shepherd RK, Coco A, Epp SB, Crook JM (2005) Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J Comp Neurol* 486:145-158.
- van Loon MC, Ramekers D, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Grolman W, Klis SFL, Versnel H (2013) Spiral ganglion cell morphology in guinea pigs after deafening and neurotrophic treatment. *Hear Res* 298:17-26.
- Versnel H, Agterberg MJH, De Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Klis SFL (2007) Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 231:1-12.
- Waaiker L, Klis SFL, Ramekers D, van Deurzen MHW, Hendriksen FGJ, Grolman W (2013) The peripheral processes of spiral ganglion cells after intracochlear application of brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *Otol Neurotol* 34:570-578.
- Wang X, Hao J, Leung G, Breitkopf T, Wang E, Kwong N, Akhoundsadegh N, Warnock GL, Shapiro J, McElwee KJ (2015) Hair follicle dermal sheath derived cells improve islet allograft survival without systemic immunosuppression. *J Immunol Res* 607328.
- WHO (2017) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>. Geraadpleegd op 12 mei 2017.
- Wilson BS, Dorman MF (2008) Cochlear implants: a remarkable past and a brilliant future. *Hear Res* 242:3-21.
- Wise AK, Fallon JB, Neil AJ, Pettingill LN, Geaney MS, Skinner SJ, Shepherd RK (2011) Combining cell-based therapies and neural prostheses to promote neural survival. *Neurotherapeutics* 8:774-787.

### 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?

Het globale doel van dit project is uiteindelijk bij te dragen aan het verbeteren van het gehoor van dove en ernstig slechthorende mensen met een cochleair implantaat. De subdoelen (hieronder beschreven) hebben gemeen dat een optimale conditie van de gehoorzenuw centraal staat: behoud door optimaliseren van de implantatietechnieken, bescherming door neurotrofe behandeling, en herstel door middel van stamceltherapie. Het is duidelijk dat de conditie van de gehoorzenuw als link tussen het implantaat en het brein cruciaal is, maar dit is in mensen amper te onderzoeken. In dierexperimenteel onderzoek kunnen we zowel de doofheid (en daarmee dus de mate van degeneratie) als daaropvolgende mogelijke interventies goed controleren. Belangrijker nog is dat we met gedetailleerde histologische analyse de effecten van zowel de doofheid zelf als de mogelijke behandelingen duidelijk in kaart kunnen brengen.

Onze nauwe samenwerking met de kliniek maakt translatie van onze bevindingen in proefdieren naar humane toepassingen mogelijk. Zo is dierproef 1 een wisselwerking tussen dierexperimenteel en humaan (postmortem) onderzoek. Daarnaast is het promotieonderzoek waar dierproef 2 onderdeel van uitmaakt erop gericht een klinische trial op te zetten waarin dove patiënten met neurotrofe factoren behandeld zullen worden.

1) beperking van trauma door insertie van de elektrodenbundel

- Welk type elektrodenbundel (recht of voorgevormd) is het minst traumatisch op korte en langere termijn?
- In hoeverre beïnvloedt weefselreactie op de aanwezigheid van de elektrodenbundel (fibrose, ossificatie) de functionaliteit van het cochleair implantaat.

2) neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw

- Welke (combinatie van) neurotrofe factor(en) zorgt voor optimale functionele en structurele bescherming van de gehoorzenuw?
- Kunnen we een eenvoudige klinisch toepasbare toedieningsmethode ontwikkelen, die niet aan effectiviteit inboet in vergelijking met bestaande invasieve experimentele methoden?

3) effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw.

- Heeft chronische cochleaire implantatie een negatief effect op de structuur (aantal en morfologie van zenuwcellen) of de elektrofysiologie van de gehoorzenuw?
- Heeft daarnaast chronische elektrische stimulatie met de geïmplanteerde elektrodenbundel een effect (positief of negatief) op de structuur of de elektrofysiologie van de gehoorzenuw?
- Hoe beïnvloeden chronische elektrische stimulatie en de neurotrofe behandeling zoals toegepast in dierproef 2 elkaar?

4) herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie

- hoeveel stamcellen overleven de transplantatie en hoe lang?
- ontwikkelen de stamcellen zich tot neuronen en zo ja, wat is het tijdsad van deze ontwikkeling?
- mengen de stamcellen zich met de (gedeeltelijk gedegenererde) SGC's?
- in hoeverre treedt er een immuunreactie op?
- in hoeverre treedt er functioneel herstel van de gehoorzenuw op en zo ja: welke factoren zijn daarop van invloed geweest?

5) verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie

- primair: beïnvloeden de verschillende therapieën elkaar in positieve dan wel in negatieve zin?

Om de volgende redenen schatten we in dat de haalbaarheid van het project hoog is:

- 1) na tal van studies met cavia's is in onze onderzoeksgroep ruime ervaring met de chirurgische procedures, met elektrofysiologische metingen en met histologische analyse (e.g., Versnel et al., 2007; Agterberg et al., 2008, 2009, 2010; Havenith et al., 2011, 2013, 2015; van Loon et al. 2013; Waaijer et al., 2013; Ramekers et al., 2014, 2015a, 2015b; Kroon et al., 2017);
- 2) de deelstudies met stamcellen zullen uitgevoerd worden in samenwerking met experts op het gebied van stamcellen en bioluminescentie van het LUMC (Huisman en Rivolta, 2012; Gho et al., 2016; Schomann et al., 2016; Mezzanotte et al., 2017);
- 3) de financiering voor twee van de deelstudies is rond; voor de overige is subsidie aangevraagd, maar dit is niet noodzakelijk.

### 3.3 Belang

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

De ontwikkeling van het cochleair implantaat heeft voor vele doven en ernstig slechthorenden het functionele herstel van gehoor betekend. Niettemin zijn er mensen die amper baat hebben bij cochleaire implantatie. Daarbij kan er veel verbeterd worden aan de kwaliteit van het gehoor van zelfs de mensen die functioneel goed presteren met een implantaat. Aan de ene kant is dat het terrein van de technici die de implantaten ontwikkelen; aan de andere kant dient het biologische substraat – de cochlea in het algemeen en de gehoorzenuw in het bijzonder – optimaal beschermd, begrepen, en benut te worden.

Omdat bovengenoemde terreinen met elkaar verweven zijn, is het zeer gecompliceerd om de juiste therapeutische benadering(en) te vinden voor patiënten waarvan het CI niet optimaal functioneert. Het verwerven van een overkoepelend wetenschappelijk inzicht (helicopterview) voor deze kennisterreinen is daarom van belang. De doelstellingen zoals hierboven beschreven dragen hieraan bij door (1) de nodige mechanische schade aan de cochlea door het inbrengen van de elektrodenbundel te verminderen; (2) de aangetoonde degeneratie van de gehoorzenuw te proberen tegen te gaan; (3) de effecten van de



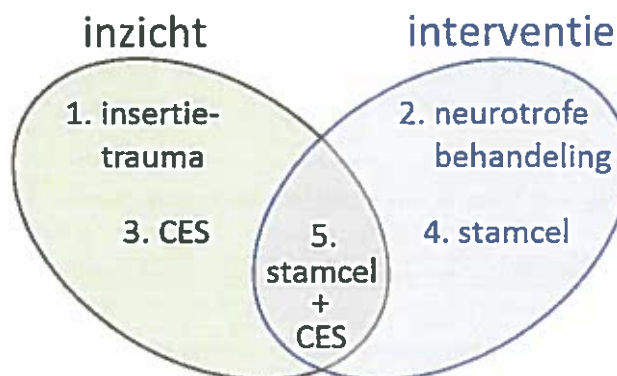
aanwezigheid van de elektrodenbundel en de continue elektrische stimulatie hiermee in kaart te brengen; en (4) te pogen de gedeeltelijk gedegenererde gehoorzenuw te regenereren met behulp van stamcellen.

Hoewel de deelstudies beschreven in deze aanvraag alle gericht zijn op een enkel klinisch/maatschappelijk doel, is er tevens een belangrijke (fundamenteel-)wetenschappelijke component. Juist omdat cochleaire implantatie een klinisch succes is, is er veel aandacht, ruimte en middelen voor onderzoek. Inmiddels is het cochleaire implantaat veruit de meest geavanceerde vorm van zogenaamde *brain-computer interfacing* (BCI), waardoor de ontwikkelingen van belang zijn voor een breder veld, inclusief neurodegeneratieve ziektes en verlamming.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De deelstudies hebben twee gemeenschappelijke en onderling samenhangende doelen, namelijk (1) het beter begrijpen van de biologie van doofheid en de invloed hierop van een cochleair implantaat, en (2) deze kennis gebruiken om nieuwe strategieën te ontwikkelen om de situatie voor mensen met een dergelijk implantaat te verbeteren. De vijf deelstudies hangen daarom nauw samen, en zijn dan ook gedeeltelijk van elkaar afhankelijk. In het onderstaande schema is de structuur van het voorgestelde project geïllustreerd.



De eerste twee dierproeven zijn het meest fundamenteel van aard: (1) analyse van acute fysieke schade aan de cochleaire structuren en (2) van moleculaire via celbiologische tot functionele analyse van farmacologische behandeling. Het grote verschil tussen deze twee dierproeven is dat de eerste de humane toepassing terugvertaalt naar een diermodel om een fundamenteeler inzicht te krijgen in de humane situatie, terwijl de tweede bedoeld is om een experimentele behandelingsmethode te ontwikkelen in een diermodel om uiteindelijk toe te passen in de mens.

Ditzelfde onderscheid kan gemaakt worden tussen de derde en vierde dierproef: de dierproef met chronische elektrische stimulatie (CES) is bedoeld om de humane situatie beter te begrijpen, terwijl stamceltherapie een gerichte experimentele behandeling tegen neurodegeneratie is. Bij dierproef 3 zal tevens het gecombineerde effect van neurotrofe behandeling (uit dierproef 2) en chronische elektrische stimulatie getest worden.

Uiteindelijk zal de combinatie van dierproeven 3 en 4 aan het eind van dit project (dierproef 5: stamcel+CES) resultaten opleveren van een nieuwe experimentele interventie in een omgeving die – binnen de beperkingen van een diermodel – grotendeels gelijk is aan die van de humane situatie van doofheid en cochleaire implantatie.

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

De onderdelen van het project (zoals in 3.1 en 3.2 hierboven al uiteengezet) zullen elk een eigen "type dierproef" omvatten. Het gehele project bestaat in wezen uit vier vraagstellingen (met bijbehorende experimentele opzet en beoogde technieken; dierproeven 1 t/m 4), die in de ideale situatie in alle mogelijke combinaties in een grote dierproef gezamenlijk getoetst zouden worden. Begrijpelijke praktische beperkingen hebben ons doen kiezen voor de huidige opzet:

1) om in een gecontroleerde setting de humane situatie na te bootsen om zo beter inzicht te krijgen in (biologische) processen die samenhangen met cochleaire implantatie (dierproef 1: insertietrauma; dierproef 3: chronische implantatie en chronische elektrische implantatie);

2) om mogelijke behandelmethoden te ontwikkelen om degeneratie van de gehoorzenuw bij mensen met een cochleair implantaat te voorkomen (dierproef 2: neurotrofe behandeling; dierproef 4: stamceltransplantatie);

3) om twee specifieke combinaties van bovengenoemde vier dierproeven te onderzoeken waarbij naar onze inschatting synergetische effecten te verwachten zijn (dierproef 5: stamceltransplantatie en chronische elektrische stimulatie; geïntegreerd in dierproef 3: neurotrofe behandeling en chronische elektrische stimulatie).

**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.**

De vijf dierproeven hebben het gezamenlijke doel cochleaire implantatie bij mensen te verbeteren door (1) de effecten van de aanwezigheid van – en stimulatie met – een intracochleaire elektrodenbundel beter te begrijpen, en (2) degeneratie van de gehoorzenuw als gevolg van zowel doofheid als de insertie/aanwezigheid van de elektrodenbundel tegen te gaan. Hieronder is per dierproef aangegeven in welke mate deze afhangt van (resultaten uit) de andere dierproeven, of van andere onderzoeksresultaten. Globaal zullen eerst dierproeven 2 en 3 (eerste deelstudie) gedaan worden; de hieruitvolgende elektrofysiologische resultaten zullen ervoor zorgen dat dierproeven 1 en 4 uitgevoerd kunnen worden, en de histologische resultaten zullen bepalen hoe deelstudie 2 van dierproef 3 uitgevoerd zal worden. Ten slotte zal dierproef 5 pas uitgevoerd worden als dierproeven 3 en 4 succesvol zijn gebleken.

Dierproef 1 (beperking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel) is onderdeel van een grotere studie met materiaal afkomstig van overleden patiënten (rotsbeenderen inclusief de cochlea). Voorafgaand aan de dierexperimenten zullen in deze humane kadaverbeenderen insertietechnieken geleerd worden en zal kennis vergaard worden over de specifieke (acute mechanische) trauma's die op kunnen treden. Omdat uit voorgaand onderzoek is gebleken dat de mate van functionele schade (in tegenstelling tot structurele schade) door insertietrauma lastig te reguleren/kwantificeren is, zullen eerst de functionele effecten van goed reguleerbare ototoxische schade in dierproeven 2 en 3 gekarakteriseerd worden. Hierna zal het naar verwachting gemakkelijker zijn om de wat variabelere mate van schade bij deze dierproef (nr. 1) te identificeren en te relateren aan structurele (anatomische) insertieschade.

Dierproef 2 (neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw) is een continuering van een project dat inmiddels 15 jaar in ons lab loopt. Bovendien is een gedeelte ervan specifiek een continuering van een studie die momenteel nog loopt (onder vergunning AVD11500201550). Aan het einde van deze dierproef zal enerzijds naar verwachting een klinische trial met neurotrofe behandeling opgezet worden; anderzijds zal de behandeling die tot het beste behoud leidt, gebruikt worden in deelstudie 2 van dierproef 3.

Dierproef 3 (effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw) is eveneens een continuering van een project dat al meerdere jaren loopt (eveneens onder vergunning AVD11500201550). Het tweede deel van deze dierproef (neurotrofe behandeling) zal pas gestart worden nadat gebleken is uit dierproef 2 welke (combinatie van) neurotrofe factoren het beste resultaat geeft op het gebied van zowel anatomische en functioneel celbehoud.

Dierproef 4 (herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie) is een continuering van een onderzoeksproject naar stamcelvisualisatie dat al jaren in Leiden loopt en waaruit onder meer gebleken



is dat stamcellen goed zichtbaar zijn met behulp van bioluminescentie beeldvorming na transplantatie in het binnenoor van een cavia. Cruciaal in deze studie is dat naast gangbare methoden om stamcellen te identificeren (bioluminescentie, immunohistochemie) tevens de elektrofysiologie van de cellen in vivo zal worden bestudeerd. Hiertoe zullen de meetmethoden zoals ontwikkeld in dierproeven 2 en 3 gebruikt worden.

Dierproef 5 (verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie) is in essentie een combinatie van deelstudies 3 en 4. Om deze reden zullen we pas starten met deze proef als de voorgaande twee succesvol afgerond zijn. Echter, het is niet noodzakelijk dat op dat moment uit dierproef 3 is gebleken dat chronische elektrische stimulatie een significant effect heeft, of dat uit dierproef 4 is gebleken dat stamceltransplantatie een positief effect heeft: het is zeer wel mogelijk dat alleen in combinatie er een positief effect optreedt (Wise et al., 2011; Hernández et al., 2016). Het succesvol afronden van beide voorafgaande dierproeven zal daarom inhouden dat de experimenten goed zijn verlopen, er geen negatieve effecten zijn gevonden, en op basis daarvan geconcludeerd kan worden dat het starten van dierproef 5 zinvol en wenselijk is.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	bepierking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel
2	neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw
3	effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw.
4	herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie
5	verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie
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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>Beperking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel.</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Beperking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel.
Volgnummer	Type dierproef					
1	Beperking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel.					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

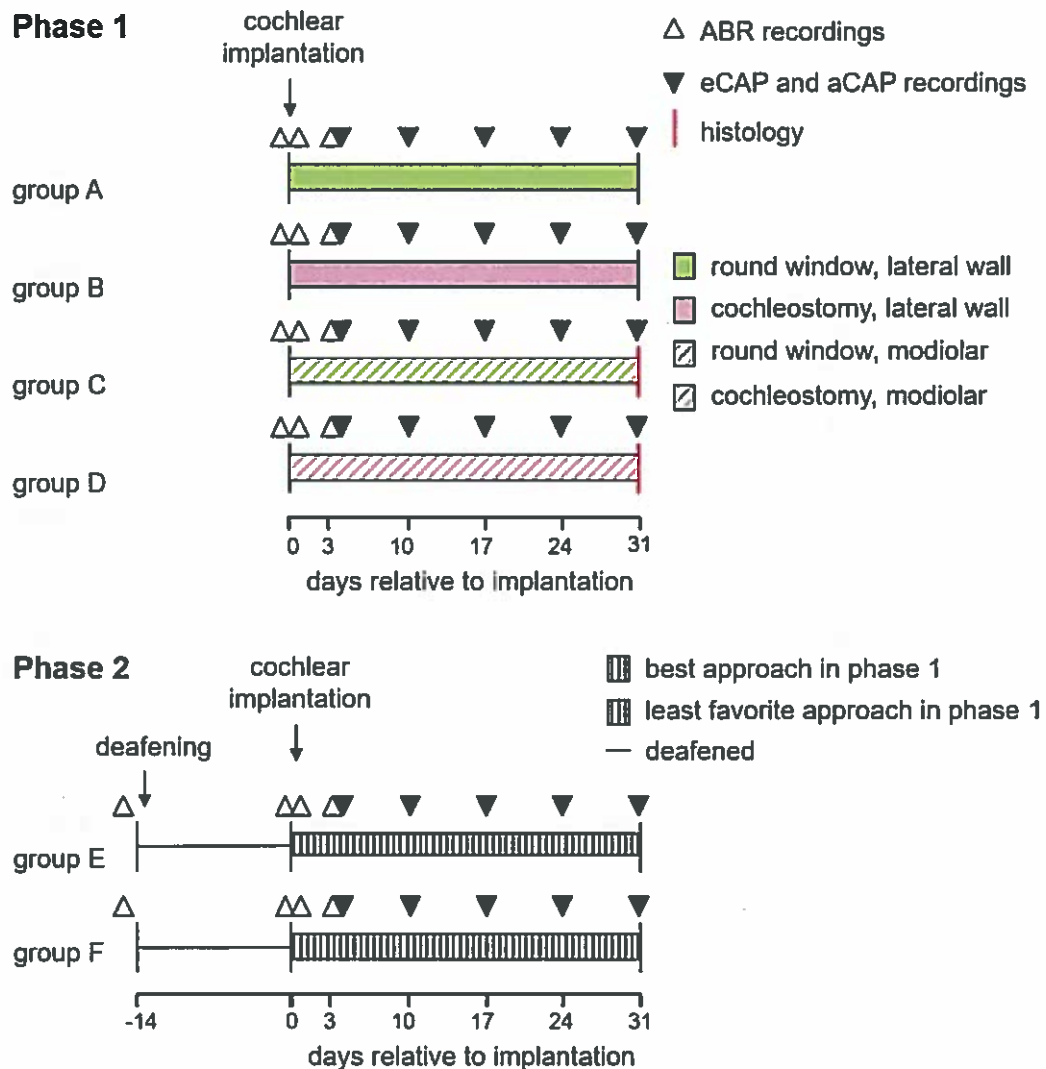
Verschillende types elektrodenbundels worden gebruikt in dove patiënten, en verschillende chirurgische benaderingen. De voor- en nadelen van deze verschillende elektrodenbundels en operaties voor structuur en functie van de cochlea, belangrijk voor het horen met een cochleair implantaat, zijn niet duidelijk. In de cavia willen we twee verschillende elektrodenbundels vergelijken die beide veel toegepast worden, *modiolar* en *lateral wall*, en de twee chirurgische benaderingen voor insertie (*round window* en *cochleostomy*, zie review in Havenith et al. 2013b). Dit willen we in de mogelijke combinaties uitvoeren, dus in 2x2=4 combinaties. Aangezien de gevolgen van insertie van de elektrodenbundel in de cochlea het duidelijkst zijn te observeren in normale cochlea's, willen we de studie in de eerste fase in normaalhorende cavia's uitvoeren (4 groepen, A-D). In de tweede fase willen we de studie in dove cavia's uitvoeren, in de klinisch relevante conditie. Hierbij willen we de combinaties testen die tot de meeste en de minste schade leidde in de normaalhorende cavia's (2 groepen, E-F). Het figuur toont het behandelingschema van de 6 groepen.

Fase 1. De cochlea's van de normaalhorende dieren worden geïmplanteerd met een elektrodenbundel (*modiolar* of *lateral wall*) volgens *round window* of *cochleostomy* benadering. Voorafgaand aan de implantatie zal het gehoor elektrofysiologisch getest worden met hersenstamresponsies (*auditory brainstem responses*, ABRs) opgewekt met akoestische geluidsstimuli (klik, hoogfrequente tonen). Direct na de operatie zullen de ABR-metingen herhaald worden om het effect van de operatie te meten. Ook zullen elektrofysiologische metingen worden verricht met behulp van de geïmplanteerde elektroden: samengestelde actiepotentialen (*compound action potentials*, CAPs) opgewekt met kliks en tonen, en opgewekt met elektrische pulsen, *acoustically evoked* en *electrically evoked* CAPs, aCAPs en eCAPs. Na 3 dagen, als de dieren hersteld zijn van de operatie, zullen ABR-, aCAP- en eCAP-metingen herhaald worden in wakkere conditie. Hierna zullen de aCAP- en eCAP-metingen wekelijks herhaald worden tot 31 dagen

vanaf de implantatie. Na de laatste aCAP- en eCAP-metingen zullen de dieren worden geëuthanaseerd en zullen beide cochlea's histologisch verwerkt worden. Histologische analyse van de cochlea's zal bestaan uit kwantificatie van het aantal haarcellen (volgens Havenith et al. 2013a), het aantal zenuwcellen (spirale ganglioncellen; SGC's), de morfologische beschrijving hiervan (van Loon et al. 2013) en het aantal van hun perifere uitlopers (Waaiker et al. 2013).

De grotere structuren (zoals basilaire membraan) zullen worden beoordeeld volgens de categorisatie van Eshraghi (2006). Door het linker- en rechteroor met elkaar te vergelijken hebben we een *within-subject* positieve controle (het linkeroor is onaangedaan).

Fase 2. Twee weken voor implantatie zullen de cavia's systemisch worden doofgemaakt. Hierna is de aanpak precies zoals in fase 1.



Primaire uitkomstparameters van ABRs: drempelwaarden in dB ten opzichte van normaal.

Primaire uitkomstparameters van aCAPs: drempelwaarden in dB ten opzichte van normaal.

Primaire uitkomstparameters van eCAPs: amplitude in  $\mu\text{V}$ , drempel in  $\mu\text{A}$ , latentie in ms (Ramekers et al. 2014).

Primaire uitkomstparameters van haarcellen: aantal.

Primaire uitkomstparameters van spirale ganglioncellen: dichtheid in aantal/ $\text{mm}^2$ .

Primaire uitkomstparameters van perifere uitlopers van spirale ganglioncellen: dichtheid in aantal/ $100 \mu\text{m}^2$ .

**Referenties:**

- Eshraghi AA (2006) Prevention of cochlear implant electrode damage. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 14:323-328.
- Havenith S, Klis SFL, Versnel H, Grolman W (2013a) A guinea pig model of selective severe high-frequency hearing loss. *Otol Neurotol* 34:1510-1518.
- Havenith S, Lammers MJW, Tange RA, Trabalzini F, della Volpe A, van der Heijden GJMG, Grolman W (2013b) Hearing preservation surgery: cochleostomy or round window approach? A systematic review. *Otol Neurotol* 34:667-674.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.
- van Loon MC, Ramekers D, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Grolman W, Klis SFL, Versnel H (2013) Spiral ganglion cell morphology in guinea pigs after deafening and neurotrophic treatment. *Hear Res* 298:17-26.
- Waaljer L, Klis SFL, Ramekers D, Van Deurzen MHW, Hendriksen FGJ, Grolman W (2013) The peripheral processes of spiral ganglion cells after intracochlear application of brain-derived neurotrophic factor in deafened guinea pigs. *Otol Neurotol* 34:570-578.

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.

**Doofmaken (beide groepen in fase 2):**

Onder algehele anesthesie worden de dieren doofgemaakt. Hiertoe wordt subcutaan kanamycine toegediend en wordt de rechter vena jugularis externa gecannuleerd, zodat furosemide kan worden geïnjecteerd. Dit is een standaardmethode van doofmaken die effectief de cochleaire haarcellen vernietigt, zonder de haarcellen van het evenwichtsorgaan te beschadigen (Versnel et al. 2007; Bremer et al. 2012).

**Cochleaire implantatie (alle groepen in fases 1 en 2):**

Onder algehele anesthesie zal een elektrodenbundel in de rechtercochlea geplaatst worden. De connector hiervan wordt m.b.v. tandartsceement en schroefjes op de schedel bevestigd. Middels het aansluiten van een humaan cochleair implantaat op deze zelfde connector kunnen de wekelijkse elektrofysiologische metingen in wakkere dieren uitgevoerd worden.

**ABR metingen (alle groepen in fases 1 en 2):**

Voor implantatie worden onder anaesthesie 3 naaldjes in de huid geplaatst (2 op het hoofd, 1 bij de achterpoot). Hiermee worden de herstenstampotentialen gemeten. Na implantatie worden de ABRs eenmaal gemeten in wakkere conditie waarbij schroeven op de schedel als elektroden worden gebruikt.

**aCAP en eCAP metingen (alle groepen in fases 1 en 2):**

Vanaf het moment van implanteren worden wekelijks aCAP en eCAP metingen gedaan in sessies van 60-90 minuten per keer. Voor eCAPs wordt elektrode-connector gekoppeld aan een humaan cochleair implantaat. Voor deze metingen is anesthesie niet nodig (wakkere conditie).

**Histologie (alle groepen in fases 1 en 2):**

Na de laatste sessie elektrofysiologische metingen zullen de dieren geëthanaseerd worden en zullen de cochlea's gefixeerd en opgewerkt worden voor *post-mortem* histologische analyse.

**Referenties:**

- Bremer HG, de Groot JCMJ, Versnel H, Klis SFL (2012) Combined administration of kanamycin and furosemide does not result in loss of vestibular function in guinea pigs. *Audiol Neurootol* 17:25-38.
- Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Klis SFL (2007) Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 231:1-12.

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

We stellen voor 12 cavia's per groep te gebruiken, dus  $6 \times 12 = 72$  cavia's in totaal. De effecten van implantatie op de histologie en functie zullen klein maar goed meetbaar zijn. Voor fase 1 (met normaalhorende cavia's) is aanzienlijk haarcelverlies te verwachten aan de basale kant van de cochlea en

daarbij horend functieverlies tot zo'n 40 dB. De verschillen tussen de 4 groepen (2 types elektrodenbundels, 2 chirurgische benaderingen) zijn moeilijk te voorspellen, aangezien een dergelijke studie niet eerder is verricht. Uitgaande van een redelijk grote spreiding zoals gevonden in een studie van insertietrauma in cavia's (Havenith, ongepubliceerd, standaarddeviaties in aCAP metingen tussen 10 en 20 dB), een klinisch relevant verschil van 20 dB, en een poweranalyse met  $\alpha=0,05$  en power = 0,80, is  $n=12$  voor fase 1 een redelijke keuze. In fase 2 (met doofgemaakte cavia's) wordt gekeken naar de benaderingen met de grootste verschillen in uitkomsten bij fase 1. De belangrijkste uitkomstmaten worden hier ontleend aan de eCAPs. Uitgaande van een standaarddeviatie van de eCAP amplitude rond 250  $\mu V$  (Ramekers et al. 2014), en een relevant van verschil van 300  $\mu V$ , is ook hier  $n=12$  een redelijke inschatting.

We hebben gekozen voor een studie-opzet waarbij we longitudinaal in dezelfde dieren het gehoor middels elektrofysiologie kunnen meten, doordat de dieren chronisch geïmplanteerd zullen worden. Per dier hebben we hierdoor wat betreft de elektrofysiologie tot 6 meetpunten in de tijd.

Naast de zes experimentele groepen vragen we geen controlegroepen aan. De niet-geïmplanteerde linkercoclea's van elk dier zullen gebruikt worden als *within-subject* controle.

## B. De dieren

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

Cavia (Dunkin Hartley, Hsd DhI: DH), afkomstig van Envigo, Horst, Nederland. De dieren zijn niet genetisch gemodificeerd en immuuncompetent.

Onderbouwing keuze proefdieren:

In gehooronderzoek wordt de cavia veel gebruikt, wat vergelijking met de literatuur mogelijk maakt. Daarbij heeft de cavia een eenvoudig te bereiken binnenoer en is het frequentiebereik relatief laag (i.e., redelijk gelijk aan dat van de mens), in tegenstelling tot andere knaagdieren. Tot slot hebben we veel ervaring met operaties en elektrofysiologische metingen bij cavia's.

We hebben gekozen voor jong-volwassen vrouwelijke cavia's van +/- 4 weken oud (+/- 300 gram). Dit omdat op jongere leeftijd minimale "natuurlijke" schade aan het gehoor is (uniformiteit) en omdat het ototoxische effect van kanamycine en furosemide op latere leeftijd minder groot is.

We kiezen voor vrouwelijke cavia's omdat deze rustiger zijn dan mannetjes. Wanneer de cavia's geïmplanteerd zijn bestaat de mogelijkheid dat mannetjes aan de externe delen van elkaars implantaten zitten. Door voor alleen vrouwelijke cavia's te kiezen kunnen we zeker zijn dat de dieren gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.

Onderbouwing aantal proefdieren:

Zoals bij A hierboven aangegeven denken we  $6*12=72$  dieren nodig te hebben. Daarnaast schatten we in ruwweg een derde (24 dieren) extra nodig te zullen hebben voor het opvangen van uitval, gezien het feit dat er met nieuwe elektrodenbundels wordt geïmplanteerd, en de round window benadering weinig gebruikt is door ons. Ook willen we graag 10 extra dieren aanvragen voor training van een nieuwe onderzoeker, die het project zal uitvoeren.

In totaal komt dit neer op  $72+24+10=106$  cavia's.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### **Vervanging**

Vervanging is niet mogelijk aangezien het gehele perifere gehoororgaan inclusief verbinding met de hersenstam via de gehoorzenuw intact en functioneel moet zijn.

#### **Vermindering**

- 1) De elektrofysiologie (aCAP- en eCAP-metingen) kunnen longitudinaal uitgevoerd worden doordat de cavia's chronisch geïmplanteerd zullen worden.
- 2) De linkercochlea's dienen als controles aangezien implantatie van de elektrodenbundel alleen rechts plaatsvindt.

#### **Verfijning - Pijn bestrijding**

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties;
- antibiotische profylaxe direct na elke operatie.

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

- 1) Alle chirurgische ingrepen worden onder algehele anesthesie gedaan; post-operatief wordt pijnstilling gegeven.
- 2) Voor de wekelijkse aCAP- en eCAP-metingen is anesthesie niet nodig, omdat uit ruime ervaring is gebleken dat deze metingen niet tot uitingen van schrik/angst/pijn leiden.
- 3) Gedurende de chirurgische ingrepen en het wakker worden zullen de dieren warm gehouden worden op een warmtemat om ongewenste afkoeling te voorkomen.
- 4) Er is gekozen voor vrouwelijke cavia's zodat ze te allen tijde gezamenlijk gehuisvest kunnen worden (zie ook onderdeel B, onderbouwing keuze proefdieren).

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

N.v.t.

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

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

### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) gehoorverlies (in fase 2 bewust geïnduceerd, in fase 1 beperkt verlies als gevolg van implantatie);
- 2) evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- 3) infectie na een operatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

ad 1: bijna volledig gehoorverlies wordt geïnduceerd om de situatie in de dove CI-gebruiker zo goed mogelijk na te bootsen;

ad 2: obstructie van cochleair aquaduct kan endolymfatische hydrops veroorzaken (~1-2% incidentie);

ad 3: risico op infectie tijdens (of vlak na) de operatie (~5% incidentie).

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

ad 1: De dosis kanamycine in fase 2 is zo gekozen dat een substantieel gehoorverlies nagenoeg gegarandeerd is. Een hogere dosis geeft wellicht volledige zekerheid, maar de kans op nierschade neemt hierdoor te veel toe;

ad 2: in het zeldzame geval dat dit gebeurt, is euthanasie de enige manier om het lijden weg te nemen;

ad 3: antibiotica na de implantatie vermindert de kans op infectie.

### 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.

- progressief gewichtsverlies na doofmaken in fase 2 (gedurende drie dagen >10% gewichtsverlies);
- oorinfectie of infectie rond connector/tandarstcement op schedel na cochleaire implantatie;
- zichtbare evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- de dieren zich niet verzorgen (verwarde vacht);
- bij lethargie langer dan 1 dag.

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



Een schatting op basis van voorgaand onderzoek: 10%-15%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

Matig

### 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.

De cochlea's moeten worden verwijderd voor histologische analyse

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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	2	Neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw.

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vierentwintig experimentele groepen cavia's zullen worden gebruikt. Met uitzondering van één groep zullen alle cavia's systemisch worden doofgemaakt. Twee weken na het doofmaken wordt er eenzijdig gelfoam gedrenkt in oplossingen met de groep specifieke geneesmiddelen (neurotrofe agentia) aangebracht op het ronde venster van de cochlea (binnenoor).

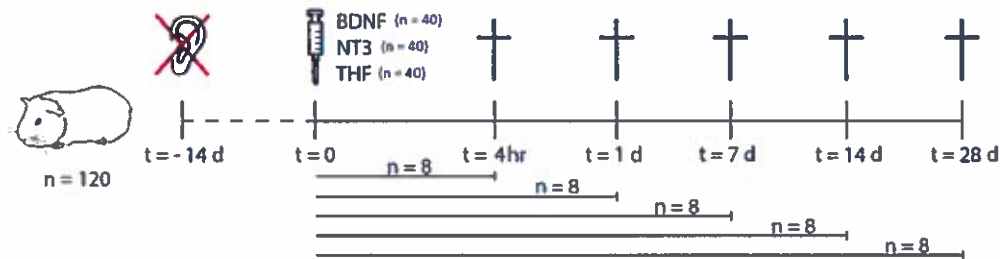
Studie 1) Bij vijftien van deze groepen zullen per neurotrofe stof op vijf gezette tijden bilateraal de cochleaire vloeistof worden geëxtraheerd, gecombineerd met het bemonsteren van het liquor cerebrospinalis (CSF). De primaire uitkomstmaten van deze bemonsteringen zijn de concentratie van de toegediende agentia (farmacokinetiek/dynamiek) op de verschillende tijdstippen. Na de extractie van deze monsters, zullen de dieren worden geëuthanaseerd, waarna beide cochlea's immunohistologisch worden verwerkt. Hierbij zal worden gekeken naar de kwantificatie, locatie, spreiding en eventuele gradiënt binnen de cochlea van tyrosine receptor kinases (Trk) A, B en C (zie onderstaand punt). We zullen beginnen met de kortste tijd na toediening van de neurotrofe stoffen, zodat als er op een bepaald tijdstip geen detectie meer mogelijk is, we de dieren uit de daaropvolgende groepen (tijdstippen) niet meer hoeven te gebruiken. Van nog eens twee groepen wordt er één als normaalhorende controlegroep gebruikt en de ander als een twee-weken-dove controlegroep. Deze twee groepen zijn positieve controles.

Studie 2) Vier weken na gelfoam-applicatie zullen bij de resterende zeven groepen elektrofysiologische metingen gedaan worden om de functionele staat van de gehoorzenuw te kunnen bepalen. De primaire uitkomstmaten van deze elektrofysiologische metingen zijn onder andere de amplitude, drempel en latentie van de elektrisch opgewekte samengestelde actiepotential (electrically evoked compound action potential; eCAP) (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b). Na deze functionele metingen zullen de dieren worden

geëuthanaseerd en zullen beide cochlea's histologisch verwerkt worden. Analyse van de cochlea's zal onder andere bestaan uit kwantificatie van het aantal zenuwcellen (spirale ganglioncellen) en de morfologische beschrijving hiervan (grootte en vorm). Door het linker- en rechteroor met elkaar te vergelijken hebben we een *within-subject* negatieve controle (beide oren zijn doof).

### Studie 1

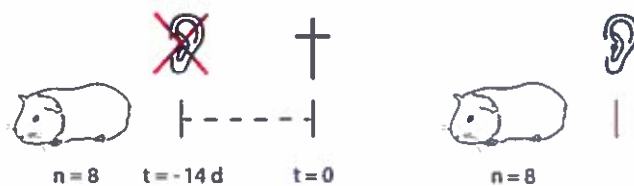
### Treatment groups



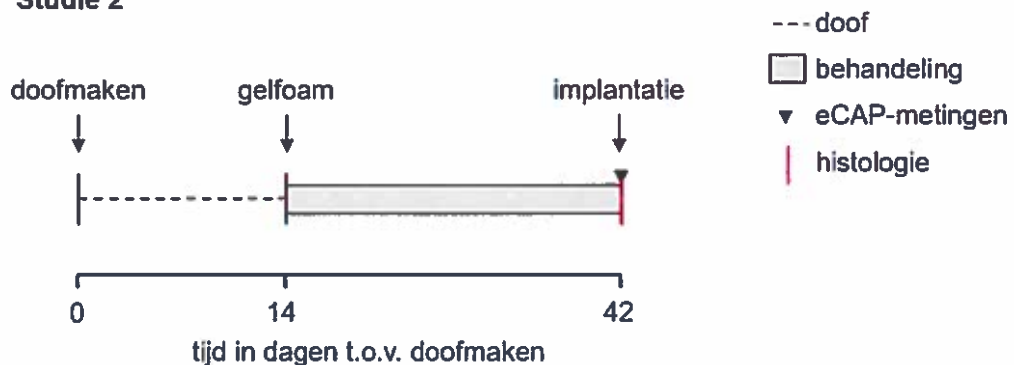
### Control groups

#### 2 week deaf control

#### normal hearing control



### Studie 2



#### Referenties:

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015b) Temporary neurotrophin treatment prevents deafness-induced auditory nerve degeneration and preserves function. *J Neurosci* 35:12331-12345.

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015a) Recovery characteristics of the electrically stimulated auditory nerve in deafened guinea pigs: relation to neuronal status. *Hear Res* 31:12-24.

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal

degeneration. J Assoc Res Otolaryngol 15:187-202.

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.

Onder algehele anesthesie worden de cavia's doofgemaakt. Hiertoe wordt subcutaan kanamycine toegediend en wordt de rechter vena jugularis externa gecannuleerd, waarin furosemide wordt geïnjecteerd. Dit is een standaardmethode van doofmaken die effectief de cochleaire haarcellen vernietigt, zonder daarbij de haarcellen van het evenwichtsorgaan te beschadigen (Versnel et al. 2007; Bremer et al. 2012).

Twee weken later (wanneer subtiele maar significante degeneratie al heeft plaatsgevonden [Ramekers et al. 2014]) zal op het ronde venster van de rechtercochlea een stukje gelfoam geplaatst worden dat gedrenkt is in een oplossing met een neurotrofe factor of met alleen PBS voor een negatieve controle. Het ronde venster wordt tijdens deze procedure geperforeerd (Havenith et al. 2015).

Vier weken na gelfoam plaatsing worden bij zeven van de vierentwintig groepen elektrofysiologische metingen uitgevoerd middels acute implantatie onder narcose, waarna de cavia's worden geëuthanaseerd voor histologische analyse van de cochlea's.

Bij 15 groepen worden op specifieke tijdstippen na gelfoam plaatsing CSF en bilateraal cochleaire vloeistof bemonsterd. Hierna worden de dieren geëuthanaseerd voor immunohistologische analyse van de cochlea's.

De toegepaste neurotrofe agentia zijn *nerve growth factor* (NGF) (alleen in studie 2), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) en neurotrofine-3 (NT-3), dit zijn de natuurlijk voorkomende agonisten van respectievelijk de tyrosine receptor kinases (Trk) A, B en C. De derde agonist is een zogenaamde *small-molecule* TrkB agonist, namelijk 7,8,3-trihydroxyflavone (7,8,3-THF).

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

De toediening van BDNF middels gelfoam op het ronde venster heeft een kleiner effect dan BDNF-toediening via een osmotische pomp (beide technieken zijn in ons lab eerder gebruikt), zowel op het structurele als op het functionele behoud van de zenuw. Hoewel we verwachten dat de effectgrootte van de combinatie van chronische elektrische stimulatie en BDNF-behandeling in de buurt komt van de effectgrootte van BDNF-behandeling via een osmotische pomp, denken we meer dieren per groep nodig te hebben dat in eerder onderzoek (met osmotische pomp), omdat de twee groepen zonder deze gecombineerde behandeling een kleinere effectgrootte zullen laten zien. Aangezien het effect van NT-3 en NGF via osmotische pomp vergelijkbaar is met dat van BDNF (Gillespie et al. 2004) zien wij geen reden aan te nemen dat effectgrootte met gelfoam anders zal zijn dan hierboven beschreven met BDNF.

Het is onbekend wat het effect is van lokale toediening van small-molecule TrkB agonisten middels een gelfoam op het ronde venster op de functionaliteit van de gehoorzenuw, maar we kunnen aannemen dat het ongeveer gelijk zal zijn aan het effect van BDNF. Zowel op structureel als op functioneel behoud van de zenuw heeft de toediening van BDNF middels gelfoam een kleiner effect dan BDNF-toediening via een osmotische pomp (beide technieken zijn in ons lab eerder gebruikt). De verwachting is dat toediening van een small-molecule TrkB agonist middels gelfoam een vergelijkbaar effect heeft als BDNF-toediening via een osmotische pomp (betere farmacokinetiek, maar minder directe toediening), waardoor eenzelfde aantal cavia's nodig wordt geacht als in voorgaande studies (8-10).

Een minimaal klinisch relevante effectgrootte zou ongeveer 20% zijn. Schattingen van standaarddeviaties van histologische en elektrofysiologische uitkomstmaten worden gebaseerd op eerdere studies (Havenith et al. 2011, 2015; Ramekers et al. 2014, 2015b). Op basis hiervan wordt het benodigde aantal dieren bepaald met een poweranalyse (power 0.80, alfa 0.05). Hiermee komen we uit op 10 dieren per groep als schatting van het benodigde aantal. Echter is gebleken uit de eerste resultaten van lopende experimenten dat de verschillen tussen groepen kleiner zijn dan vooraf gedacht. Daarom vragen we voor de zekerheid 12 dieren per groep aan voor studie 2.

Referenties:

Gillespie LN, Clark GM, Marzella PL (2004) Delayed neurotrophin treatment supports auditory neuron

survival in deaf guinea pigs. *Neuroreport* 15:1121-1125.

Havenith S, Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Sedee RJ, Grolman W, Klis SFL (2011) Spiral ganglion cell survival after round window membrane application of brain-derived neurotrophic factor using gelfoam as carrier. *Hear Res* 272:168-177.

Havenith S, Versnel H, Klis SFL, Grolman W (2015) Local delivery of brain-derived neurotrophic factor on the perforated round window membrane in guinea pigs. *Otol Neurotol* 36:705-713.

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015b) Temporary neurotrophin treatment prevents deafness-induced auditory nerve degeneration and preserves function. *J Neurosci* 35:12331-12345.

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.

## B. De dieren

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

- Cavia (Dunkin Hartley, Hsd DhI: DH) van Envigo: in gehooronderzoek wordt de cavia veel gebruikt, waardoor de keuze voor de cavia vergelijking met de literatuur mogelijk maakt. Daarbij heeft de cavia een eenvoudig te bereiken binnenoor en is het frequentiebereik relatief laag (i.e., redelijk gelijk aan dat van de mens). Tot slot hebben we (om eerdergenoemde redenen) veel ervaring met operaties en elektrofysiologische metingen bij cavia's.

- We willen jong-volwassen cavia's gebruiken van  $\pm 4$  weken oud ( $\pm 300$  g). Dit omdat op jongere leeftijd minimale "natuurlijke" schade aan het gehoor is (uniformiteit) en omdat het ototoxische effect van kanamycine en furosemide op latere leeftijd minder groot is. Vanwege redenen vermeld in onderdeel D hieronder willen we enkel vrouwelijke cavia's gebruiken.

- voor alle dieren geldt:  
niet genetisch gemodificeerd;  
immuuncompetent.

- BELANGRIJK: een deel van de in deze aanvraag beschreven experimenten (studie 2) zijn al gestart onder projectnummer AVD11500201550. Bij verlening van deze vergunning zullen de experimenten geheel onder de nieuwe vergunning verder gaan.

- Vanwege kleinere verschillen in de elektrofysiologische metingen dan vooraf ingeschat in de experimenten die we inmiddels uitgevoerd hebben, vragen wij toestemming om de 10 dieren per groep uit het oorspronkelijke project (hierboven vermeld) aan te vullen tot 12 per groep.

- In totaal denken we ongeveer 265 cavia's nodig te hebben: 12 dieren per groep voor de zeven elektrofysiologie groepen, 8 dieren per groep voor de 17 farmacodynamiek groepen en in totaal 45 voor het optimaliseren van het model (studie 1; ongeveer 15) en voor het opvangen van uitval (ongeveer 30). Onder uitval verstaan we incidentele gevallen zoals het niet bereiken van het beoogde gehoorverlies na doofmaken, infectie na doofmaken of gelfoam plaatsing, en complicaties bij de operaties.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

**1) Vermindering/verfijning:**

De linkercoclea's kunnen als negatieve controles dienen aangezien deze ook hun haarcellen verliezen (doofmaken gebeurt systemisch) en alle manipulaties (neurotrofe behandeling en elektrische stimulatie) vinden alleen rechts plaats.

Er zal gebruik worden gemaakt van gegevens uit voorgaande proeven. Dit betreft elektrofysiologische en histologische gegevens van normaalhorende controles.

Vermindering door gebruik van zowel mannetjes als vrouwtjes is niet wenselijk vanwege de volgende overwegingen:

a) Eerdere proeven zijn gedaan met vrouwelijke cavia's, dit maakt dat de resultaten onderling vergelijkbaar en gebruik van data onderling verwisselbaar. Dit maakt dat er in totaal minder proefdieren nodig zijn.

b) Vrouwelijke cavia's zijn rustiger. Uit ervaring weten we dat mannetjes eerder aan elkaars hechtingen/implantaten zitten en zo het risico op wondinfecties of beschadigingen vergroten. Door voor alleen vrouwelijke cavia's te kiezen kunnen we zeker zijn dat de dieren te allen tijde gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.

Verfijning/vermindering door het dynamisch uitvoeren van tijdspunt specifieke experimenten: in deze studie wordt uitgegaan van een langdurend neurotrofe aanwezigheid. Dit staat echter niet vast. Daarom worden de experimenten in deze groepen niet tegelijkertijd uitgevoerd over alle tijdspunten, maar wordt gestart met het eerste tijdspunt. Pas zodra na analyse van deze data blijkt dat voorgaande inderdaad het geval is, wordt het volgende tijdspunt uitgevoerd. Hierna volgt weer een analysestap alvorens de experimenten voor het volgende tijdspunt worden gestart, etc.

2) Vervanging is niet mogelijk aangezien het gehele perifere gehoororgaan inclusief verbinding met de hersenstam (exclusief de haarcellen) via de gehoorzenuw intact en functioneel moet zijn. Natuurlijke degeneratie van dit gehele systeem kan niet ex-vivo bestudeerd worden.

Het is daarnaast niet mogelijk deze proeven in mensen uit te voeren, aangezien de te gebruiken geneesmiddelen niet getest/goedgekeurd zijn voor humaan gebruik. Tevens is histologische analyse niet mogelijk bij mensen.

Binnen de farmacokinetiek/dynamië studie worden de dierproeven voorafgegaan aan een *in silico* studie, waarin de beweging van de cochleaire vloeistof en de eigenschappen van de te gebruiken agentia uitgebreid worden gemodelleerd. Het resultaat van deze studie moet ons voorzien van een goede inschatting voor de tijdspunten waarin de groepen zullen worden ingedeeld, zodat dit niet empirisch vastgesteld hoeft te worden.

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

1) Alle chirurgische ingrepen worden onder algehele anesthesie gedaan; post-operatief wordt pijnstilling gegeven.

2) Uit ervaring blijkt dat toediening van BDNF via gelfoam op het ronde venster brengt een kleiner risico op infectie met zich mee in vergelijking met toediening via een osmotische pomp.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

#### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### Ongeriefinschatting/humane eindpunten

#### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties.

#### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) gehoorverlies (bewust geïnduceerd);
- 2) infectie na een operatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- 1) kanamycine;
- 2) risico op infectie tijdens (of vlak na) de operatie (~5% incidentie).

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

- 1) n.v.t.;
- 2) antibiotica na de implantatie vermindert de kans op infectie.

#### 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.

- Progressief gewichtsverlies na doofmaken (gedurende drie dagen >10% gewichtsverlies);
- oorinfectie na applicatie gelfoam;
- de dieren zich niet verzorgen (verwarde vacht);
- bij lethargie langer dan 1 dag

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

Een schatting op basis van voorgaand onderzoek: 5%.

### **K. Classificatie van ongerief**

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

Licht: de normaalhorende dieren die onbehandeld geëuthanaseerd worden voor studie 1;

Matig: alle overige dieren (die zullen ontwaken uit narcose).

## **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.

De cochlea's moeten worden verwijderd voor (immuno)histologische analyse.

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

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw.</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	3	Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw.
Volgnummer	Type dierproef				
3	Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw.				

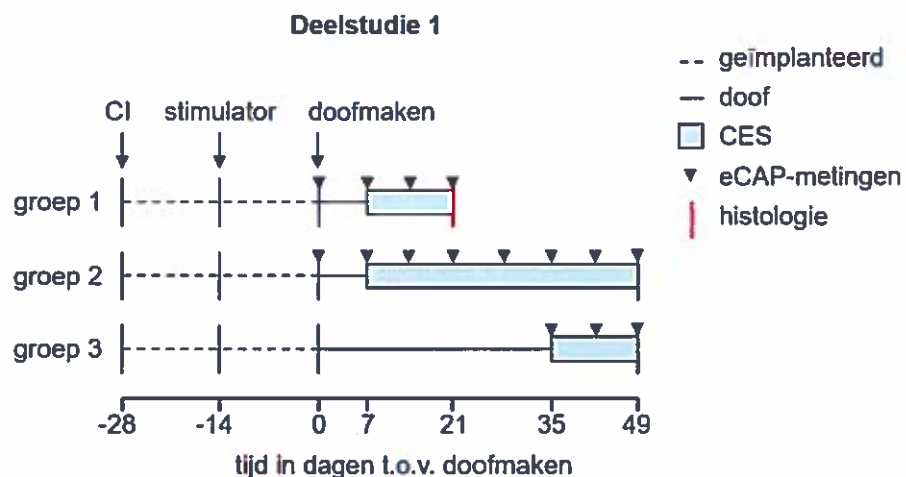
*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

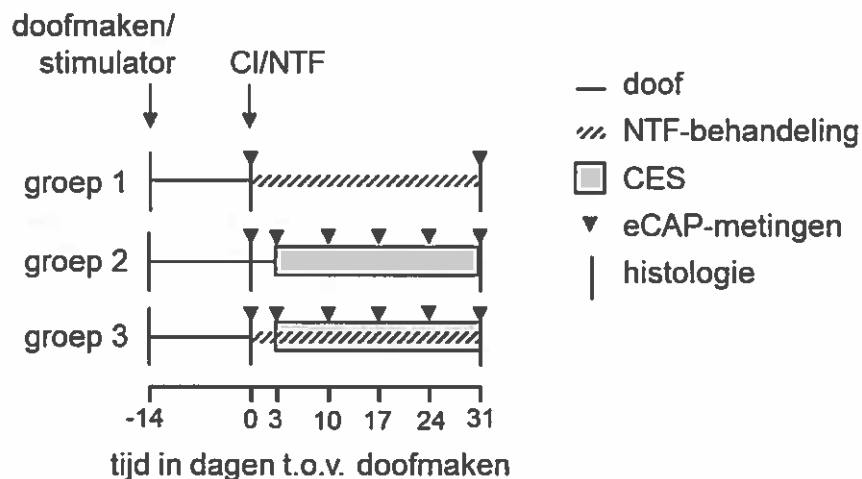
Zes experimentele groepen cavia's zullen worden gebruikt, gelijk verdeeld over twee samenhangende deelstudies.





In deelstudie 1 (CES-studie) zal bij de cavia's uit alle drie groepen eerst een intracochleaire elektrodenbundel geplaatst worden, gevolgd door een tweede operatie twee weken later waarbij een stimulator subcutaan in de linkerflank geplaatst wordt, die middels elektrodedraad verbonden wordt met de elektrodenbundel. Nog eens twee weken later zullen de dieren onder narcose doofgemaakt worden. Na minimaal een week rust om te herstellen van deze laatste operatie zal de stimulator aangezet worden en zal de gehoorzenuw van de dieren gedurende de lichtperiode in de dag/nachtcyclus chronisch elektrisch gestimuleerd worden, zoals dat bij mensen met een cochleair implantaat gebeurt. De duur van de periode van stimulatie zal variëren per experimentele groep. Wekelijks vanaf het moment van implantatie zullen elektrofyysiologische metingen gedaan worden met behulp van de elektrodenbundel om de functionele staat van de gehoorzenuw in de tijd te kunnen volgen.

## Deelstudie 2



In deelstudie 2 (CES/NTF-studie) zullen de dieren van alle drie groepen eerst doofgemaakt worden; daarbij zullen de dieren van experimentele groepen 2 en 3 tevens een stimulator in de linkerflank geïmplantéerd krijgen. Twee weken later zal de intracochleaire elektrodenbundel geplaatst worden, die aan de stimulator gekoppeld zal worden. Gelijktijdig met deze laatste operatie zal bij de dieren van experimentele groepen 1 en 3 op het ronde venster van de cochlea een stukje gelfoam gedrenkt in neurotrofe stof opgelost in fysiologisch zout; groep 2 ontvangt een stukje gelfoam gedrenkt enkel in fysiologische zout. De keuze voor de neurotrofe factor (NTF) hangt af van Dierproef 2, waarin de meest geschikte stof of combinatie van stoffen onderzocht zal worden.

Afhankelijk van de experimentele groep zullen de cavia's 6-11 weken na de eerste operatie geëthanaseerd worden en zullen beide cochlea's histologisch verwerkt worden.

De toevoeging van de NTF in deze studie t.o.v. deelstudie 1 is bedoeld om te verifiëren dat ook in de humane situatie (waarbij de gehoorzenuw chronische elektrisch gestimuleerd wordt) de neurotrofe behandeling zoals uitgebreid onderzocht in Dierproef 2 positieve effecten op de gehoorzenuw zal hebben. De verwachting is dat chronische elektrische stimulatie de neurotrofe behandeling niet zal hinderen, of zelfs zal versterken door de combinatie van biochemische en elektrische activatie van de zenuwcellen.

De primaire uitkomstmaten van de elektrofyysiologische metingen zijn onder andere de amplitude, drempel en latentie van de elektrisch opgewekte samengestelde actiepotential (electrically evoked compound action potential; eCAP) (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b).

Histologische analyse van de cochlea's zal bestaan uit kwantificatie van het aantal zenuwcellen (spiraal ganglioncellen; SGC's), de morfologische beschrijving hiervan (grootte en vorm) (van Loon et al. 2013; Ramekers et al. 2014; Ramekers et al. 2015b).

Referenties:

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015a) Recovery characteristics of the electrically stimulated auditory nerve in deafened guinea pigs: relation to neuronal status. *Hear Res* 31:12-24.

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015b) Temporary neurotrophic treatment prevents deafness-induced auditory nerve degeneration and preserves functionality. *J Neurosci* 35:12331-12345.

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.

van Loon MC, Ramekers D, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Grolman W, Klis SFL, Versnel H (2013) Spiral ganglion cell morphology in guinea pigs after deafening and neurotrophic treatment. *Hear Res* 298:17-26.

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.

**Doofmaken (alle groepen):**

Onder algehele anesthesie worden de dieren doofgemaakt. Hiertoe wordt subcutaan kanamycine toegediend en wordt de rechter vena jugularis externa gecannuleerd, zodat furosemide kan worden geïnjecteerd. Dit is een standaardmethode van doofmaken die effectief de cochleaire haarcellen vernietigt, zonder de haarcellen van het evenwichtsorgaan te beschadigen (Versnel et al. 2007; Bremer et al. 2012).

**Cochleaire implantatie (alle groepen):**

Onder algehele anesthesie zal een elektrodenbundel in de rechtercochlea geplaatst worden. De connector hiervan wordt m.b.v. tandartsceement op de schedel bevestigd. Middels het aansluiten van een commercieel humaan cochleair implantaat (wordt niet geïmplantéerd) op deze zelfde connector kunnen de wekelijkse elektrofysiologische metingen in wakkere dieren uitgevoerd worden.

**Implanteren stimulator (alle groepen m.u.v. deelstudie 2, groep 1):**

Onder algehele anesthesie zal subcutaan in de linkerflank een stimulator geplaatst worden die met elektrodekabel aan connector op de schedel gekoppeld wordt. Middels transcutane infraroodcommunicatie kan deze stimulator aan- en uitgezet worden, en kan de intensiteit van de stimulatie aangepast worden.

**Behandeling met gelfoam (alle groepen van deelstudie 2):**

Tijdens de cochleaire implantatie wordt een stukje gelfoam gedrenkt in fysiologisch zout op het ronde venster van de blootgelegde cochlea geplaatst, vlak voordat de elektrodenbundel geplaatst wordt. Bij groepen 1 en 3 zal de zoutoplossing een neurotrofe factor (NTF) bevatten.

**Elektrofysiologische metingen (alle groepen):**

Vanaf het moment van implanteren worden wekelijks elektrofysiologische metingen gedaan in sessies van 30-60 minuten per keer middels koppeling van de elektrode-connector aan een commercieel humaan cochleair implantaat (wordt niet geïmplantéerd; alleen aangesloten om metingen te kunnen verrichten). Voor deze metingen is anesthesie niet nodig.

**Chronische elektrische stimulatie (alle groepen m.u.v. deelstudie 2 groep 1):**

Afhankelijk van de experimentele groep zal de stimulator enkele weken na implantatie middels transcutane infraroodcommunicatie aangezet worden, zodat de gehoorzenuw gedurende de lichtperiode in de dag/nachtcyclus elektrisch gestimuleerd wordt. De duur van deze chronische elektrische stimulatie is eveneens afhankelijk van de experimentele groep en zal 2, 4, of 6 weken zijn.

**Alle groepen:**

Na de laatste sessie elektrofysiologische metingen zullen de dieren opgeofferd worden en zullen de cochlea's gefixeerd en opgewerkt worden voor *post-mortem* histologische analyse.

**Referenties:**

Bremer HG, de Groot JCMJ, Versnel H, Klis SFL (2012) Combined administration of kanamycin and furosemide does not result in loss of vestibular function in guinea pigs. *Audiol Neurootol* 17:25-38.

Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Klis SFL (2007) Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res*

231:1-12.

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

We hebben gekozen voor een studie-opzet waarbij we longitudinaal in dezelfde dieren de functionele degeneratie van de gehoorzenuw middels elektroфизиologie kunnen meten, doordat de dieren chronisch geïmplanteerd zullen worden. Per dier hebben we hierdoor wat betreft de elektroфизиologie tot 12 meetpunten in de tijd, waarvoor bij acute implantatie meerdere dieren nodig zouden zijn.

Naast de drie experimentele groepen vragen we geen (positieve of negatieve) controlegroepen aan. Voor positieve controles (normaalhorende dieren) kunnen we data gebruiken uit eerdere studies met eCAP-metingen (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b). De onbehandelde linkercochlea's van elk dier zullen gebruikt worden als *within-subject* negatieve controle: omdat het doofmaken systemisch zal gebeuren zijn beide oren nagenoeg gelijkmatig aangedaan.

De primaire uitkomstparameters waarop we de schatting van het benodigde aantal dieren baseren, zijn het aantal spirale ganglioncellen (histologie) en de maximale amplitude van de eCAP (elektroфизиologie).

Het aantal spirale ganglioncellen in 6-weeken dove cavia's is ongeveer 650 cellen/mm<sup>2</sup> tegenover 1600 cellen/mm<sup>2</sup> in normaalhorende cavia's (Ramekers et al. 2014), en naar verwachting zal dit niet veel anders zijn na de 4-7 weken van doofheid zoals in de huidige aanvraag uiteindelijk de duur van doofheid is. Naar verwachting zal de chronische elektrische stimulatie op zichzelf niet leiden tot betere overleving van de spirale ganglioncellen, en verwachten we daarom een celdichtheid van ongeveer 600 cellen/mm<sup>2</sup> (sd: 200 cellen/mm<sup>2</sup>). Behandeling met neurotrofe factoren (met name BDNF) middels gelfoam op het ronde venster heeft in het verleden aangetoond beperkt maar significant celbehoud op te leveren, wat mogelijk versterkt kan worden door de chronische elektrische stimulatie (e.g., Shepherd et al. 2005). Naar schatting: 900 cellen/mm<sup>2</sup> (sd: 300 cellen/mm<sup>2</sup>).

In dezelfde 6-weeken dove dieren was de maximale eCAP amplitude ongeveer 1000  $\mu$ V (ongeveer 1800  $\mu$ V in normaalhorenden), met een standaarddeviatie van 150  $\mu$ V. In het geval dat de 900 cellen/mm<sup>2</sup> in de met NTF behandelde groep elektrofysiologisch functioneel zijn, verwachten we een maximale eCAP amplitude van 1200  $\mu$ V en een iets grotere standaarddeviatie (~200  $\mu$ V).

Een powerberekening met celoverleving (effect size 1,18; alfa 0,05; power 0,80) en met maximale eCAP amplitude (effect size 1,13; alfa 0,05; power 0,80) leveren respectievelijk 10 en 11 dieren per groep op. Aangezien we hier uitgaan van de groep met het duidelijkste effect, is het realistisch om 12 dieren per groep aan te vragen.

#### Referenties:

Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.

Shepherd RK, Coco A, Epp SB, Crook JM (2005) Chronic depolarization enhances the trophic effects of brain-derived neurotrophic factor in rescuing auditory neurons following a sensorineural hearing loss. *J Comp Neurol* 486:145-58.

#### B. De dieren

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

Cavia (Dunkin Hartley, Hsd Dhl: DH), afkomstig van Envigo, Horst, Nederland. De dieren zijn niet genetisch gemodificeerd en immuuncompetent.

#### Onderbouwing keuze proefdieren:

In gehooronderzoek wordt de cavia veel gebruikt, wat vergelijking met de literatuur mogelijk maakt. Daarbij heeft de cavia een eenvoudig te bereiken binnenoer en is het frequentiebereik relatief laag (i.e., redelijk gelijk aan dat van de mens), in tegenstelling tot andere knaagdieren. Tot slot hebben we veel ervaring met operaties en elektrofysiologische metingen bij cavia's.

We hebben gekozen voor jong-volwassen vrouwelijke cavia's van +/- 4 weken oud (+/- 300 gram). Dit omdat op jongere leeftijd minimale "natuurlijke" schade aan het gehoor is (uniformiteit) en omdat het

ototoxische effect van kanamycine en furosemide op latere leeftijd minder groot is.

We kiezen voor vrouwelijke cavia's omdat deze rustiger zijn dan mannetjes. Wanneer de cavia's geïmplanteerd zijn bestaat de mogelijkheid dat mannetjes aan de externe delen van elkaars implantaten zitten. Door voor alleen vrouwelijke cavia's te kiezen kunnen we zeker zijn dat de dieren gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.

**BELANGRIJK:** een deel van de in deze aanvraag beschreven experimenten zijn al gestart onder projectnummer AVD11500201550. Het betreft hier een gedeelte van de eerste deelstudie, waarin 42 dieren van de origineel aangevraagde 50 zijn gebruikt. Het grootste gedeelte van deze dieren is gebruikt voor het ontwikkelen en optimaliseren van de experimentele procedures en van de implanteerbare stimulator. Inmiddels is de optimale experimentele opzet bereikt, en hebben we met de eerste paar dieren succesvol het gehele experimentele traject doorlopen.

Onderbouwing aantal proefdieren:

Zoals bij A hierboven aangegeven denken we  $6 \times 12 = 72$  dieren nodig te hebben. Daarnaast schatten we in ruwweg een derde extra nodig te zullen hebben voor het opvangen van uitval, gezien de complexiteit van de implantaties en de duur van de experimentele periode per dier. Dit is een ruime schatting, gebaseerd op voornamelijk technische problemen uit het verleden (elektrodebreuk, uittreding van de elektrodenbundel, niet goed functioneren van de stimulator gedurende de gehele stimulatieperiode van maximaal 6 weken). De optelsom van deze risico's over een lange experimentele periode (tot 11 weken) maakt dat substantiële uitval te verwachten is. Nb: de chirurgische procedures zijn inmiddels zo verfijnd dat uitval op biologische gronden (zoals overlijden tijdens operaties of infecties) niet substantieel zal zijn - dit betekent dat de verwachte substantiële uitval veelal niet gepaard zal gaan met additioneel ongerief. Daarbij zullen de dieren bij deze vorm van uitval waarschijnlijk fysiek gezond zijn, en daarmee nog geschikt zijn voor hergebruik. Verdere ontwikkeling van het model is in dit stadium niet meer aan de orde.

In totaal komt dit neer op  $72 + 28 = 100$  cavia's.

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

### **Vervanging**

Vervanging is niet mogelijk aangezien het gehele perifere gehoororgaan inclusief verbinding met de hersenstam (exclusief de haarcellen) via de gehoorzenuw intact en functioneel moet zijn. Natuurlijke degeneratie van dit gehele systeem kan niet *ex vivo* bestudeerd worden.

### **Vermindering**

- 1) De elektrofysiologie (eCAP-metingen) kunnen longitudinaal uitgevoerd kunnen worden doordat de cavia's chronisch geïmplanteerd zullen worden.
- 2) De linkercochlea's dienen als negatieve controles aangezien deze ook hun haarcellen verliezen (doofmaken gebeurt systemisch) en implantatie alleen rechts plaatsvindt.
- 3) Voorts is ervoor gekozen om geen normaalhorende controlegroep te gebruiken, omdat vergelijking met functie en aantallen zenuwcellen in de gezonde situatie zal gebeuren met de data van normaalhorende controles uit voorgaande studies.

### **Verfijning - Pijn bestrijding**

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties;
- antibiotische profylaxe direct na elke operatie.

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

- 1) Alle chirurgische ingrepen worden onder algehele anesthesie gedaan; post-operatief wordt pijnstilling gegeven.
- 2) De chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw zal voor elk dier een andere drempel hebben voor een gehoorsensatie, maar ook voor het gevoel van pijnlijk hard geluid. De implanteerbare stimulator is daarom zo ontworpen dat het stimulatie-niveau (stroomsterkte) na implantatie via infraroodcommunicatie op afstand (door de huid) aangepast kan worden. Enerzijds kunnen we dan met behulp van de wekelijkse elektrofysiologische metingen de stroomsterkte instellen op een niveau dat nog net een respons van de zenuw opwekt (ondergrens), en anderzijds kunnen we een maximaal comfortabele stroomsterkte ("maximum comfortable level") als bovengrens instellen. Omdat dit - anders dan bij mensen met een CI - lastig in te schatten is, zullen de cavia's direct na het aanzetten van de chronische elektrische stimulatie goed gecontroleerd (observaties van het gedrag) worden. Schrikreacties bij het aanzetten zijn te verwachten, maar gewenning aan de "nieuwe" gehoorsensatie zal snel moeten optreden, anders is het stimulatie-niveau te hoog.
- 3) Voor de wekelijkse eCAP-metingen is anesthesie niet nodig, omdat uit ruime ervaring is gebleken dat deze metingen niet tot uitingen van schrik/angst/pijn leiden.
- 4) Gedurende de chirurgische ingrepen en het wakker worden zullen de dieren warm gehouden worden op een warmtemat om ongewenste afkoeling te voorkomen.
- 5) Er is gekozen voor vrouwelijke cavia's zodat ze te allen tijde gezamenlijk gehuisvest kunnen worden (zie ook onderdeel B, onderbouwing keuze proefdieren).
- 6) Omdat de stimulator onderhuids geplaatst wordt, kunnen de dieren gedurende de stimulatieperiode vrij bewegen, en hoeven ze niet solitair gehuisvest te worden.

## **Herhaling en duplicering**

### **E. Herhaling**

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

N.v.t.

## **Huisvesting en verzorging**

### **F. Huisvesting en verzorging**

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

verzorgd?

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) gehoorverlies (bewust geïnduceerd);
- 2) gehoorsensatie door elektrische stimulatie (kan mogelijk onaangenaam zijn);
- 3) evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- 4) infectie na een operatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

ad 1: bijna volledig gehoorverlies wordt geïnduceerd om de situatie in de dove CI-gebruiker zo goed mogelijk na te bootsen;

ad 2: chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw en stimulatie tijdens het uitvoeren van elektrofysiologische metingen;

ad 3: obstructie van cochleair aquaduct kan endolymfatische hydrops veroorzaken (~1-2% incidentie);

ad 4: risico op infectie tijdens (of vlak na) de operatie (~5% incidentie).

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

ad 1: N.v.t.;

ad 2: door de implanteerbare stimulators uit te rusten met infraroodcommunicatie, kan het stimulatie-niveau op elk moment tijdens de proef aangepast worden (observatie van gedrag direct na aan- en uitzetten van de elektrische stimulatie [bijvoorbeeld schrikreactie, vestibulaire respons], en elektrofysiologische metingen; zie D);

ad 3: in het zeldzame geval dat dit gebeurt, is euthanasie de enige manier om het lijden weg te nemen;

ad 4: antibiotica na de implantatie vermindert de kans op infectie.

#### 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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

#### Humane eindpunten

- progressief gewichtsverlies na doofmaken (gedurende drie dagen >10% gewichtsverlies);
- oorinfectie of infectie rond connector/tandarcement op schedel na cochleaire implantatie;
- zwelling/infectie i.c.m. uittreding van de stimulator;
- zichtbare evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- de dieren zich niet verzorgen (verwarde vacht);
- bij lethargie langer dan 1 dag.

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

Een schatting op basis van voorgaand onderzoek: 10-20%.

#### K. Classificatie van ongerief

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

matig

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

De cochlea's moeten worden verwijderd voor histologische analyse

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.

X Ja





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>Herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie.</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	4	Herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie.
Volgnummer	Type dierproef					
4	Herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie.					

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

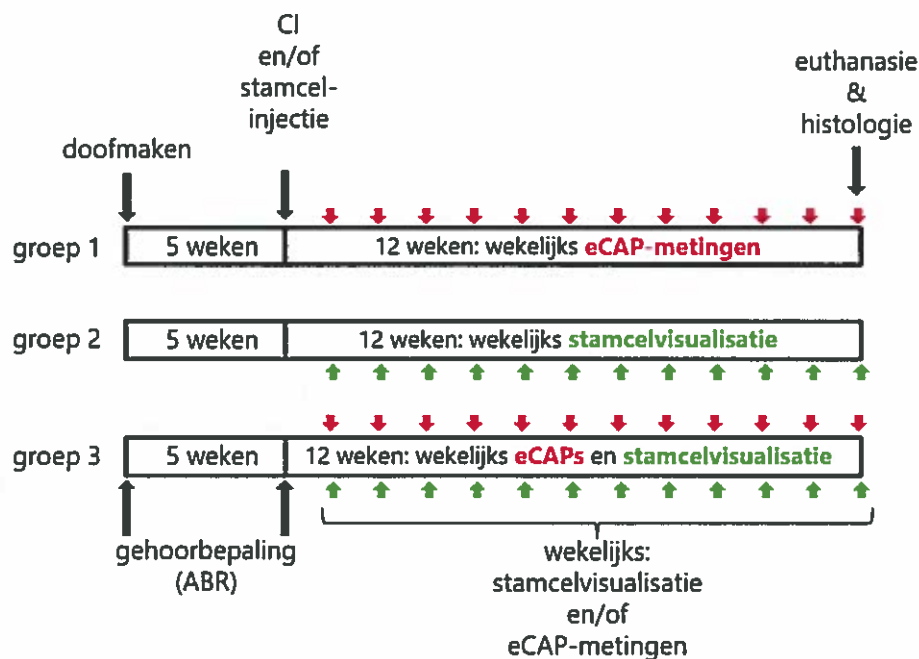
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Drie experimentele groepen cavia's zullen worden gebruikt. Alle cavia's worden eerst systemisch doofgemaakt en ondergaan vijf weken later een tweede operatie waarbij (1) een intracochleaire elektrodenbundel geplaatst wordt, (2) genetisch gemanipuleerde, bioluminescerende, haar-follikel-bulge stamcellen (HFBCs) in de modiolus van de cochlea getransplanteerd worden, of (3) een combinatie van (1) en (2). Wekelijks vanaf het moment van implantatie/transplantatie zal de status van de getransplanteerde stamcellen gevolgd worden door middel van bioluminescentie-beeldvorming (groepen 2 en 3). Tevens zullen wekelijks elektrofysiologische metingen gedaan worden met behulp van de elektrodenbundel om de functionele staat van de gehoorzenuw in de tijd te kunnen volgen (groepen 1 en 3). Twaalf weken na implantatie/transplantatie zullen de cavia's van alle groepen geëuthanaseerd worden en zullen beide cochlea's histologisch verwerkt worden.

De HFBC's zullen geogst worden uit surplusmuizen; haarfollikels komen uit de snor (de whiskerpad); per haarfollikel is de opbrengst ongeveer 10.000 cellen na 3 passages; per muis kunnen ongeveer 36 haarfollikels geogst worden; 1 muis is dus meer dan voldoende voor 1 transplantatie. De gehele procedure van oogsten, transfectie, opkweken en beeldvorming *in vitro* en *in vivo* wordt beheerst door de afdeling KNO van het LUMC (Gho et al., 2016; Schomann et al., 2016), waarmee dit project in samenwerking zal worden uitgevoerd.

De primaire uitkomstmaten van de elektrofysiologische metingen zijn onder andere de amplitude, drempel en latentie van de elektrisch opgewekte samengestelde actiepotentiaal (*electrically evoked compound action potential*; eCAP) (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b). De primaire uitkomstmaten van de transplantatie met bioluminescerende stamcellen zijn overleving, verdubbeling dan wel vermindering van stamcellen en de (neurale) ontwikkeling daarvan in de tijd (Gho et al. 2015; Schomann et al. 2016; Mezzanotte et al. 2017). Na euthanasie zal histologische analyse van de cochlea's bestaan uit kwantificatie van het aantal





zenuwcellen (spirale ganglioncellen; SGC's), de morfologische beschrijving hiervan (grootte en vorm) en uitgebreid immunohistochemisch onderzoek. Ook de stamcellen zullen dan gekarakteriseerd worden.

#### Referenties

- Gho CG, Schomann T, de Groot SC, Frijns JHM, Rivolta MN, Neumann MH, Huisman MA (2015) Isolation, expansion and neural differentiation of stem cells from human plucked hair: a further step towards autologous nerve recovery. *Cytotechnology* 68:1849-1858.
- Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM (2017) In vivo molecular bioluminescence imaging: new tools and applications. *Trends Biotechnol* 35:640-652.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015a) Recovery characteristics of the electrically stimulated auditory nerve in deafened guinea pigs: relation to neuronal status. *Hear Res* 31:12-24.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015b) Temporary neurotrophic treatment prevents deafness-induced auditory nerve degeneration and preserves functionality. *J Neurosci* 35:12331-12345.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.
- Schomann T, Mezzanotte L, Lourens IM, de Groot JCMJ, Frijns JHM, Huisman MA (2016) Lentiviral transduction and subsequent loading with nanoparticles do not affect cell viability and proliferation in hair-follicle-bulge-derived stem cells in vitro. *Contrast Media Mol Imaging* 11:550-560.

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.

#### Alle groepen:

Onder algehele anesthesie worden de dieren doofgemaakt. Hiertoe wordt subcutaan kanamycine toegediend en wordt de rechter vena jugularis externa gecannuleerd, zodat furosemide kan worden geïnjecteerd. Dit is een standaardmethode van doofmaken die effectief de cochleaire haarcellen vernietigt, zonder de haarcellen van het evenwichtsorgaan te beschadigen (Versnel et al. 2007; Bremer et al. 2012).

#### Groepen 1 en 3:

Vijf weken na het doofmaken zal onder algehele anesthesie een elektrodenbundel in de rechtercochlea geplaatst worden. De connector hiervan wordt m.b.v. tandartsceмент op de schedel bevestigd. Middels het

aansluiten van een humaan cochleair implantaat op deze connector kunnen de wekelijkse elektrofysiologische metingen in wakkere dieren uitgevoerd worden.

Groepen 2 en 3:

Eveneens vijf weken na het doofmaken zal onder algehele anesthesie in de modiolus van de rechtercochlea een suspensie van 5 µl stamcellen geïnjecteerd worden (ongeveer 200.000 cellen). Bij de cavia's van groep 3 zullen eerst de stamcellen geïnjecteerd worden, gevolgd door het plaatsen van de elektrodenbundel via dezelfde opening in de cochlea. De stamcellen die wij willen gebruiken zijn stamcellen uit de haarfollikel bulge (HFBSC's). Dit is een relatief onbekend type stamcel, maar met meerdere voordelen in vergelijking met de meer gangbare mesenchymale en embryonale stamcellen, gezien toekomstige transplantaties in de mens: i) de procedure om haarfollikels te oogsten is bij de mens minimaal invasief, HFBSC's kunnen zelfs uit geplukte haren geoogst worden; ii) HFBSC's komen van origine uit de neurale lijst en zijn dan ook neurale voorlopercellen. HFBSC's zullen naar verwachting dan ook na transplantatie niet de neiging hebben om weer terug naar het oorspronkelijke celtype differentiëren, zoals mesenchymale cellen; iii) HFBSC's vormen geen tumoren in vivo; iv) de haarfollikel is een immuun tolerant gebied, de HFBSC's zullen na transplantatie mogelijk geen, tot nauwelijks een afstotingsreactie veroorzaken, waardoor immunosuppressiva naar alle waarschijnlijkheid overbodig zijn. Het gebruik van HFBSC's voor stamceltherapie in het binnenoor lijkt veelbelovend te zijn, omdat deze cellen zich in vivo kunnen ontwikkelen tot neuronen en gliacellen en daardoor de gedegenererde SGC's uit de gehoorzenuw kunnen vervangen. Bovendien kunnen neurale stamcellen groeifactoren uitscheiden, die daardoor ook herstellend op de gedegenererde SGC's kunnen werken.

Groepen 1 en 3:

Vanaf het moment van implanteren worden wekelijks (i.e., dertienmaal) elektrofysiologische metingen gedaan in sessies van 30-60 minuten per keer middels koppeling van de elektrode-connector aan een humaan cochleair implantaat. Voor deze metingen is anesthesie niet nodig.

Groepen 2 en 3:

Bioluminescentie-beeldvorming zal eveneens wekelijks plaatsvinden, vanaf het moment van stamceltransplantatie. Een lichte anesthesie zal hiervoor toegepast worden. Voor aanvang van deze procedure krijgen de dieren een enzym (D-luciferine) toegediend, waardoor de stamcellen bioluminescent licht gaan uitstralen.

Alle groepen:

Na de laatste sessie elektrofysiologische metingen en/of bioluminescentie-beeldvorming zullen de dieren opgeofferd worden en zullen de cochlea's gefixeerd en opgewerkt worden voor *post-mortem* histologische analyse, bestaande uit kwantitatieve microscopie en immunohistochemie.

Referenties:

Bremer HG, de Groot JCMJ, Versnel H, Klis SFL (2012) Combined administration of kanamycin and furosemide does not result in loss of vestibular function in guinea pigs. *Audiol Neurootol* 17:25-38.

Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Klis SFL (2007) Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 231:1-12.

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

We hebben gekozen voor een studie-opzet waarbij we longitudinaal in dezelfde dieren in vivo de stamcellen over tijd na transplantatie kunnen volgen, zowel met imaging als met elektrofysiologie. We kunnen hierdoor de processen van proliferatie, maturatie, en differentiatie volgen in de cochlea van een enkel proefdier, waar met andere methoden meerdere dieren nodig zouden zijn.

Naast de drie experimentele groepen vragen we geen (positieve of negatieve) controlegroepen aan. Voor positieve controles (normaalhorende dieren) kunnen we data gebruiken uit eerdere studies met eCAP-metingen (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b); positieve controles m.b.t. bioluminescentie is niet aan de orde aangezien de gezonde cochlea geen luminescente activiteit vertoont. De onbehandelde linkerochlea's van elk dier zullen gebruikt worden als *within-subject* negatieve controle: omdat het doofmaken systemisch zal

gebeuren zijn beide oren nagenoeg gelijkmatig aangedaan.

Het is uiteindelijk de bedoeling dat de getransplanteerde stamcellen zich ontwikkelen tot functionele spirale ganglioncellen. De primaire uitkomstparameters waarop we de schatting van het benodigde aantal dieren baseren, zijn daarom het aantal spirale ganglioncellen (histologie) en de maximale amplitude van de eCAP (elektrofysiologie), aangezien vooralsnog onbekend is wat het bioluminescente signaal op zal leveren.

Het aantal spirale ganglioncellen in 14-weeken dove cavia's is een kwart van het aantal in normaalhorende cavia's (400 vs. 1600 cellen/mm<sup>2</sup>; Ramekers et al. 2015b), en naar verwachting zal dit niet veel minder zijn na 17 weken van doofheid zoals in de huidige aanvraag uiteindelijk de duur van doofheid is. In de groep zonder stamcellen (groep 1) verwachten we daarom een celdichtheid van ongeveer 400 cellen/mm<sup>2</sup> (sd: 160 cellen/mm<sup>2</sup>). In het geval dat de stamceltherapie aanslaat, verwachten we een relatief sterk effect, maar met een grotere variatie tussen dieren. Naar schatting: 700 cellen/mm<sup>2</sup> (sd: 300 cellen/mm<sup>2</sup>).

In dezelfde 14-weeken dove dieren was de maximale eCAP amplitude 700 µV (ongeveer 1800 µV in normaalhorenden), met een standaarddeviatie van 330 µV. In het geval dat de 700 cellen/mm<sup>2</sup> in de stamcelconditie elektrofysiologisch functioneel zijn, verwachten we een maximale eCAP amplitude van 1200 µV en een soortgelijke standaarddeviatie.

Met een power van 0.8 en een  $\alpha$  van 0.05, is een *sample size* van 10 dieren per groep daarom voor beide uitkomstparameters realistisch.

---

## B. De dieren

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

Cavia (Dunkin Hartley, Hsd Dhl: DH), afkomstig van Envigo, Horst, Nederland. De dieren zijn niet genetisch gemodificeerd en immuuncompetent.

Onderbouwing keuze proefdieren:

In gehooronderzoek wordt de cavia veel gebruikt, wat vergelijking met de literatuur mogelijk maakt. Daarbij heeft de cavia een eenvoudig te bereiken binnenoer en is het frequentiebereik relatief laag (i.e., redelijk gelijk aan dat van de mens), in tegenstelling tot andere knaagdieren. Tot slot hebben we veel ervaring met operaties en elektrofysiologische metingen bij cavia's.

We hebben gekozen voor jong-volwassen vrouwelijke cavia's van +/- 4 weken oud (+/- 300 gram). Dit omdat op jongere leeftijd minimale "natuurlijke" schade aan het gehoor is (uniformiteit) en omdat het ototoxische effect van kanamycine en furosemide op latere leeftijd minder groot is.

We kiezen voor vrouwelijke cavia's omdat deze rustiger zijn dan mannetjes. Wanneer de cavia's geïmplantatoerd zijn bestaat de mogelijkheid dat mannetjes aan de externe delen van elkaars implantaten zitten. Door voor alleen vrouwelijke cavia's te kiezen kunnen we zeker zijn dat de dieren gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.

Onderbouwing aantal proefdieren:

Zoals bij A hierboven aangegeven hebben we naast de drie experimentele groepen geen controlegroepen nodig. De inschatting op basis van het beschikbare vergelijkingsmateriaal is dat 10 dieren per groep voldoende moet zijn – bij elkaar 30 cavia's.

Van de twee cruciale technieken in deze studie wordt chronische cochleaire implantatie van cavia's voldoende beheerst in onze groep. De andere techniek – het transplanteren van stamcellen in de cochlea levende cavia's – is nieuw, en om deze techniek onder de knie te krijgen (vooral in combinatie met cochleaire implantatie) zullen we extra dieren nodig hebben. We zullen de methode om door de bulla, vervolgens door de cochleostomie, en uiteindelijk door de benige wand van de modiolus in de gehoorzenuw de stamcellen te kunnen inspuiten met een micromanipulator moeten ontwikkelen. Naar schatting zullen dit 15 cavia's zijn.

Tot slot moeten we rekening houden met uitval, bijvoorbeeld doordat cavia's niet doof genoeg worden, door elektrodebreuk, complicaties bij de relatief complexe operaties, infecties na operaties, etc. Gezien de complexiteit van deze studie schatten we in dat ongeveer een derde van de cavia's zal uitvallen, waardoor we bovenop de 30 benodigde dieren nog eens 15 cavia's nodig zullen hebben.

In totaal komt dit neer op 30+15+15=60 cavia's.

---

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

---

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

##### **Vervanging**

Vervanging is niet mogelijk aangezien het gehele perifere gehoororgaan inclusief verbinding met de hersenstam (exclusief de haarcellen) via de gehoorzenuw intact en functioneel moet zijn. Natuurlijke degeneratie van dit gehele systeem na specifieke haarcelschade kan niet *ex vivo* bestudeerd worden.

##### **Vermindering**

- 1) Het gebruik van *in vivo* bioluminescentie imaging om de stamcellen te detecteren, zal het aantal proefdieren aanzienlijk doen verminderen. Dit is een longitudinale studie en door de *in vivo* detectie van stamcellen, hoeven de dieren pas aan het einde van de experimentele periode opgeofferd te worden, in plaats van na iedere verschillende tijdsperiode. De haalbaarheid van bioluminescentie imaging in cavia's is eerder onderzocht in een studie met kadaverdieren. Deze techniek wordt aangevuld met elektrofysiologie (eCAP-metingen), die eveneens longitudinaal uitgevoerd kunnen worden doordat de cavia's chronisch geïmplantiseerd zullen worden.
- 2) De linkerochlea's dienen als negatieve controles aangezien deze ook hun haarcellen verliezen (doofmaken gebeurt systemisch) en stamceltransplantatie alleen rechts plaatsvindt.
- 3) Voorts is ervoor gekozen om geen normaalhorende controlegroep te gebruiken, omdat vergelijking met functie en aantallen zenuwcellen in de gezonde situatie zal gebeuren met de data van normaalhorende controles uit voorgaande studies.

##### **Verfijning - Pijn bestrijding**

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties;
- antibiotische profylaxe direct na elke operatie.

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

- 1) Alle chirurgische ingrepen worden onder algehele anesthesie gedaan; postoperatief wordt pijnstilling gegeven.
- 2) Voor de wekelijkse eCAP-metingen is anesthesie niet nodig, omdat uit ruime ervaring is gebleken dat deze metingen niet tot uitingen van schrik/angst/pijn leiden.
- 3) Voor de bioluminescentie-imaging is een lichte narcose voldoende, aangezien de enige vereiste is dat de dieren stilliggen.
- 4) De dieren zullen de eerste twee weken na stamceltransplantatie driemaal per week getemperatuurd worden om een eventueel immunologische reactie op de stamcellen vroegtijdig te kunnen waarnemen en zo nodig te kunnen ondervangen met immunosuppressiva. Echter een significante afstotingsreactie wordt niet verwacht omdat cellen uit haarfollikels zich immunologisch kunnen afschermen (Wang et al. 2015) en eveneens omdat de cavia stamceltransplantaties goed verdraagt (Hildebrand et al. 2005).
- 5) Gedurende de chirurgische ingrepen en het wakker worden zullen de dieren warm gehouden worden op een warmtemat om ongewenste afkoeling te voorkomen.
- 6) Er is gekozen voor vrouwelijke cavia's zodat ze te allen tijde gezamenlijk gehuisvest kunnen worden

(zie ook onderdeel B, onderbouwing keuze proefdieren).

**Referenties:**

Wang X, Hao J, Leung G, Breikopf T, Wang E, Kwong N, Akhoundsadegh N, Warnock GL, Shapiro J, McElwee KJ (2015) Hair follicle dermal sheath derived cells improve islet allograft survival without systemic immunosuppression. J Immunol Res 2015:607328.  
Hildebrand MS, Dahl HH, Hardman J, Coleman B, Shepherd RK, de Silva MG (2005) Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. J Assoc Res Otolarynol 6:341-354.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) gehoorverlies (bewust geïnduceerd);
- 2) evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- 3) infectie na een operatie;
- 4) afstotingsreactie na stamceltransplantatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

ad 1: bijna volledig gehoorverlies wordt geïnduceerd om de situatie in de dove CI-gebruiker zo goed mogelijk na te bootsen;

ad 2: obstructie van cochleair aquaduct kan endolymfatische hydrops veroorzaken (~1-2% incidentie);

ad 3: risico op infectie tijdens (of vlak na) de operatie (~5% incidentie);

ad 4: mogelijke afstotingsreactie op de lichaamsvreemde stamcellen.

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

ad 1: N.v.t.;

ad 2: in het zeldzame geval dat dit gebeurt, is euthanasie de enige manier om het lijden weg te nemen;

ad 3: antibiotica na de implantatie vermindert de kans op infectie;

ad 4: in het geval van postoperatieve temperatuurstijging worden immunosuppressiva toegediend.

### 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.

#### Humane eindpunten

- progressief gewichtsverlies na doofmaken (gedurende drie dagen >10% gewichtsverlies);
- oorinfectie of infectie rond connector/tandarcement op schedel na cochleaire implantatie;
- zichtbare evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- de dieren zich niet verzorgen (verwarde vacht);
- bij lethargie langer dan 1 dag.

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

Een schatting op basis van voorgaand onderzoek: 10-15%.

### K. Classificatie van ongerief

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

## 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.

De cochlea's moeten worden verwijderd voor histologische analyse.

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.

X Ja

---





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

1. Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
2. Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en toevoegen.
3. Meer informatie vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
4. Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Volgnummer</th> <th style="text-align: left;">Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">5</td> <td>Verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie.</td> </tr> </tbody> </table>	Volgnummer	Type dierproef	5	Verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie.
Volgnummer	Type dierproef					
5	Verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie.					

*Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.*

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

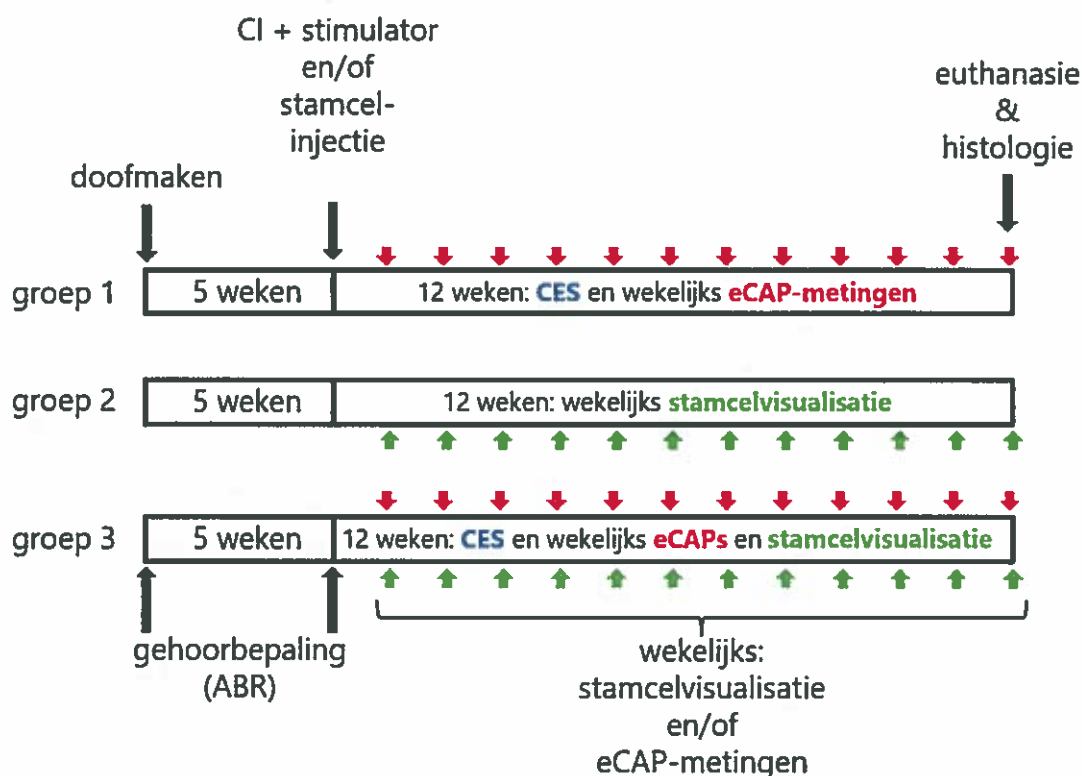
Beschrijf de keuze van de experimentele aanpak en de primaire uitkomstparameters.

Drie experimentele groepen cavia's zullen worden gebruikt. Alle cavia's worden eerst systemisch doofgemaakt en ondergaan vijf weken later een tweede operatie waarbij (1) een intracochleaire elektrodenbundel geplaatst wordt verbonden aan een subcutaan geplaatste stimulator, (2) genetisch gemanipuleerde, bioluminescerende, haar-follikel-bulge stamcellen (HFBCs) in de modiolus van de cochlea getransplanteerd worden, of (3) een combinatie van (1) en (2). Wekelijks vanaf het moment van implantatie/transplantatie zal de status van de getransplanteerde stamcellen gevolgd worden door middel van bioluminescentie-beeldvorming (groepen 2 en 3). Tevens zullen wekelijks elektrofysiologische metingen gedaan worden met behulp van de elektrodenbundel om de functionele staat van de gehoorzenuw in de tijd te kunnen volgen (groepen 1 en 3). Middels de geïmplanteerde stimulator zal vanaf 1 week na implantatie de gehoorzenuw van groepen 1 en 3 daarbij chronisch elektrisch gestimuleerd worden; deze stimulatie bootst de dagelijkse stimulatie na zoals plaatsvindt bij mensen met een cochleair implantaat. Twaalf weken na implantatie/transplantatie zullen de cavia's van alle groepen geëuthanaseerd worden en zullen beide cochlea's histologisch verwerkt worden.

De primaire uitkomstmaten van de elektrofysiologische metingen zijn onder andere de amplitude, drempel en latentie van de elektrisch opgewekte samengestelde actiepotentiaal (*electrically evoked compound action potential*; eCAP) (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b). De primaire uitkomstmaten van de transplantatie met bioluminescerende stamcellen zijn overleving, verdubbeling dan wel vermindering van stamcellen en de (neurale) ontwikkeling daarvan (Gho et al. 2015; Schomann et al. 2016; Mezzanotte et al. 2017).

Histologische analyse van de cochlea's zal bestaan uit kwantificatie van het aantal zenuwcellen (spiraal ganglioncellen; SGC's), de morfologische beschrijving hiervan (grootte en vorm) en uitgebreid immunohistochemisch onderzoek.

De groep die zowel stamcellen als chronische elektrische stimulatie ontvangt zal naar verwachting meer nieuwe functionele spirale ganglioncellen bevatten dan de groep zonder stimulatie; om dit aan te kunnen tonen is de combinatie van alle drie de meettechnieken (elektrofysiologie, bioluminescentie en histologie) cruciaal.



#### Referenties

- Gho CG, Schomann T, de Groot SC, Frijns JHM, Rivolta MN, Neumann MH, Huisman MA (2015) Isolation, expansion and neural differentiation of stem cells from human plucked hair: a further step towards autologous nerve recovery. *Cytotechnology* 68:1849-1858.
- Mezzanotte L, van 't Root M, Karatas H, Goun EA, Löwik CWGM (2017) In vivo molecular bioluminescence imaging: new tools and applications. *Trends Biotechnol* 35:640-652.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015a) Recovery characteristics of the electrically stimulated auditory nerve in deafened guinea pigs: relation to neuronal status. *Hear Res* 31:12-24.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Klis SFL, Grolman W (2015b) Temporary neurotrophic treatment prevents deafness-induced auditory nerve degeneration and preserves functionality. *J Neurosci* 35:12331-12345.
- Ramekers D, Versnel H, Strahl SB, Smeets EM, Klis SFL, Grolman W (2014) Auditory-nerve responses to varied inter-phase gap and phase duration of the electric pulse stimulus as predictors for neuronal degeneration. *J Assoc Res Otolaryngol* 15:187-202.
- Schomann T, Mezzanotte L, Lourens IM, de Groot JCMJ, Frijns JHM, Huisman MA (2016) Lentiviral transduction and subsequent loading with nanoparticles do not affect cell viability and proliferation in hair-follicle-bulge-derived stem cells in vitro. *Contrast Media Mol Imaging* 11:550-560.

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.

#### Alle groepen:

Onder algehele anesthesie worden de dieren doofgemaakt. Hiertoe wordt subcutaan kanamycine toegediend en wordt de rechter vena jugularis externa gecannuleerd, zodat furosemide kan worden geïnjecteerd. Dit is een standaardmethode van doofmaken die effectief de cochleaire haarcellen vernietigt, zonder de haarcellen van het evenwichtsorgaan te beschadigen (Versnel et al. 2007; Bremer et al. 2012).

#### Groepen 1 en 3:

Vijf weken na het doofmaken zal onder algehele anesthesie een elektrodenbundel in de rechtercochlea geplaatst worden. De connector hiervan wordt m.b.v. tandartsceмент op de schedel bevestigd. Subcutaan in de linkerflank zal een stimulator geplaatst worden die met elektrodekabel aan connector op de schedel gekoppeld wordt. Middels het aansluiten van een humaan cochleair implantaat op deze zelfde connector kunnen de wekelijkse elektrofysiologische metingen in wakkere dieren uitgevoerd worden.

#### Groepen 2 en 3:

Eveneens vijf weken na het doofmaken zal onder algehele anesthesie in de modiolus van de rechtercochlea een suspensie van 5  $\mu$ l stamcellen geïnjecteerd worden (ongeveer 200.000 cellen). Bij de cavia's van groep 3 zullen eerst de stamcellen geïnjecteerd worden, gevolgd door het plaatsen van de elektrodenbundel via dezelfde opening in de cochlea. De stamcellen die wij willen gebruiken zijn stamcellen uit de haarfollikel bulge (HFBSC's). Dit is een relatief onbekend type stamcel, maar met meerdere voordelen in vergelijking met de meer gangbare mesenchymale en embryonale stamcellen, gezien toekomstige transplantaties in de mens: i) de procedure om haarfollikels te oogsten is bij de mens minimaal invasief, HFBSC's kunnen zelfs uit geplukte haren geoogst worden; ii) HFBSC's komen van origine uit de neurale lijst en zijn dan ook neurale voorlopercellen. HFBSC's zullen naar verwachting dan ook na transplantatie niet de neiging hebben om weer terug naar het oorspronkelijke celtype differentiëren, zoals mesenchymale cellen; iii) HFBSC's vormen geen tumoren in vivo; iv) de haarfollikel is een immuun tolerant gebied, de HFBSC's zullen na transplantatie mogelijk geen, tot nauwelijks een afstotingsreactie veroorzaken, waardoor immunosuppressiva naar alle waarschijnlijkheid overbodig zijn. Het gebruik van HFBSC's voor stamceltherapie in het binnenoor lijkt veelbelovend te zijn, omdat deze cellen zich in vivo kunnen ontwikkelen tot neuronen en gliacellen en daardoor de gedegenererde SGC's uit de gehoorzenuw kunnen vervangen. Bovendien kunnen neurale stamcellen groeifactoren uitscheiden, die daardoor ook herstellend op de gedegenererde SGC's kunnen werken.

#### Groepen 1 en 3:

Vanaf het moment van implanteren worden wekelijks (i.e., dertienmaal) elektrofysiologische metingen gedaan in sessies van 30-60 minuten per keer middels koppeling van de elektrode-connector aan een humaan cochleair implantaat. Voor deze metingen is anesthesie niet nodig. Vanaf 1 week na de implantatie zal de stimulator middels transcutane infraroodcommunicatie aangezet worden, zodat de gehoorzenuw gedurende de lichtperiode in de dag/nachtcyclus elektrisch gestimuleerd wordt.

#### Groepen 2 en 3:

Bioluminescentie-beeldvorming zal eveneens wekelijks plaatsvinden, vanaf het moment van stamceltransplantatie. Een lichte anesthesie zal hiervoor toegepast worden. Voor aanvang van deze procedure krijgen de dieren een enzym (D-luciferine) toegediend, waardoor de stamcellen bioluminescent licht gaan uitstralen.

#### Alle groepen:

Na de laatste sessie elektrofysiologische metingen en/of bioluminescentie-beeldvorming zullen de dieren opgeofferd worden en zullen de cochlea's gefixeerd en opgewerkt worden voor *post-mortem* histologische analyse, bestaande uit kwantitatieve microscopie en immunohistochemie.

#### Referenties:

Bremer HG, de Groot JCMJ, Versnel H, Klis SFL (2012) Combined administration of kanamycin and furosemide does not result in loss of vestibular function in guinea pigs. *Audiol Neurootol* 17:25-38.

Versnel H, Agterberg MJH, de Groot JCMJ, Smoorenburg GF, Klis SFL (2007) Time course of cochlear electrophysiology and morphology after combined administration of kanamycin and furosemide. *Hear Res* 231:1-12.

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

We hebben gekozen voor een studie-opzet waarbij we longitudinaal in dezelfde dieren in vivo de stamcellen over tijd na transplantatie kunnen volgen, zowel met imaging als met elektrofysiologie. We kunnen hierdoor de processen van proliferatie, maturatie, en differentiatie volgen in de cochlea van een enkel proefdier, waar met andere methoden meerdere dieren nodig zouden zijn.

Naast de drie experimentele groepen vragen we geen (positieve of negatieve) controlegroepen aan. Voor positieve controles (normaalhorende dieren) kunnen we data gebruiken uit eerdere studies met eCAP-metingen (Ramekers et al. 2014, 2015a, 2015b); positieve controles m.b.t. bioluminescentie is niet aan de orde aangezien de gezonde cochlea geen luminescente activiteit vertoont. De onbehandelde linkercochlea's van elk dier zullen gebruikt worden als *within-subject* negatieve controle: omdat het doofmaken systemisch zal gebeuren zijn beide oren nagenoeg gelijkmatig aangedaan.

Het is uiteindelijk de bedoeling dat de getransplanteerde stamcellen zich ontwikkelen tot functionele spirale ganglioncellen. De primaire uitkomstparameters waarop we de schatting van het benodigde aantal dieren baseren, zijn daarom het aantal spirale ganglioncellen (histologie) en de maximale amplitude van de eCAP (elektrofysiologie), aangezien vooralsnog onbekend is wat het bioluminescente signaal op zal leveren.

Het aantal spirale ganglioncellen in 14-weeken dove cavia's is een kwart van het aantal in normaalhorende cavia's (400 vs. 1600 cellen/mm<sup>2</sup>; Ramekers et al. 2015b), en naar verwachting zal dit niet veel minder zijn na 17 weken van doofheid zoals in de huidige aanvraag uiteindelijk de duur van doofheid is. Naar verwachting zal de chronische elektrische stimulatie op zichzelf niet leiden tot betere overleving van de spirale ganglioncellen. In de groep zonder stamcellen (groep 1) verwachten we daarom een celdichtheid van ongeveer 400 cellen/mm<sup>2</sup> (sd: 160 cellen/mm<sup>2</sup>). In het geval dat de stamceltherapie aanslaat, verwachten we een relatief sterk effect, maar met een grotere variatie tussen dieren. Naar schatting: 700 cellen/mm<sup>2</sup> (sd: 300 cellen/mm<sup>2</sup>).

In dezelfde 14-weeken dove dieren was de maximale eCAP amplitude 700  $\mu$ V (ongeveer 1800  $\mu$ V in normaalhorenden), met een standaarddeviatie van 330  $\mu$ V. In het geval dat de 700 cellen/mm<sup>2</sup> in de stamcelconditie elektrofysiologisch functioneel zijn, verwachten we een maximale eCAP amplitude van 1200  $\mu$ V en een soortgelijke standaarddeviatie.

De toevoeging van chronische elektrische stimulatie zal op de celoverleving hooguit een beperkt effect hebben, maar zal naar verwachting voornamelijk resulteren in betere elektrische activiteit, wat met de eCAP-metingen waar te nemen zal zijn. De effectgrootte is echter lastig in te schatten.

Gezien de geschatte benodigde dieraantallen in de dierproeven met chronische elektrische stimulatie (volgnummer 3) en stamcellen (volgnummer 4) afzonderlijk, is een *sample size* van 15 dieren per groep daarom voor de genoemde uitkomstparameters realistisch.

---

## B. De dieren

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

Cavia (Dunkin Hartley, Hsd Dhl: DH), afkomstig van Envigo, Horst, Nederland. De dieren zijn niet genetisch gemodificeerd en immuuncompetent.

Onderbouwing keuze proefdieren:

In gehooronderzoek wordt de cavia veel gebruikt, wat vergelijking met de literatuur mogelijk maakt. Daarbij heeft de cavia een eenvoudig te bereiken binnenoer en is het frequentiebereik relatief laag (i.e., redelijk gelijk aan dat van de mens), in tegenstelling tot andere knaagdieren. Tot slot hebben we veel ervaring met operaties en elektrofysiologische metingen bij cavia's.

We hebben gekozen voor jong-volwassen vrouwelijke cavia's van +/- 4 weken oud (+/- 300 gram). Dit omdat op jongere leeftijd minimale "natuurlijke" schade aan het gehoor is (uniformiteit) en omdat het ototoxische effect van kanamycine en furosemide op latere leeftijd minder groot is.

We kiezen voor vrouwelijke cavia's omdat deze rustiger zijn dan mannetjes. Wanneer de cavia's geïmplanteerd zijn bestaat de mogelijkheid dat mannetjes aan de externe delen van elkaars implantaten zitten. Door voor alleen vrouwelijke cavia's te kiezen kunnen we zeker zijn dat de dieren gezamenlijk gehuisvest kunnen worden.

Onderbouwing aantal proefdieren:

Zoals bij A hierboven aangegeven hebben we naast de drie experimentele groepen geen controlegroepen nodig. De inschatting op basis van het beschikbare vergelijkingsmateriaal is dat 15 dieren per groep voldoende moet zijn – bij elkaar 45 cavia's.

Deze dierproef zal alleen plaatvinden nadat dierproeven 3 en 4 (betreffende chronische elektrische stimulatie en stamcellen, respectievelijk) succesvol zijn afgerond. Dientengevolge zullen we de benodigde (operatieve) technieken beheersen wanneer deze dierproef start, en zullen we in theorie zonder pilots of oefeningen kunnen beginnen. Echter moeten we juist in deze complexe studie rekening moeten houden met

substantiële uitval, aangezien per proefdier meerdere cruciale stappen goed moeten verlopen en gedurende een lange periode alle geïmplanteerde materialen moeten blijven functioneren. Gezien de complexiteit van deze studie schatten we in dat ongeveer 20 extra cavia's nodig zullen zijn. Dit hoge aantal is gebaseerd op verwachte technische problemen (eCAP-metingen, bioluminescentie, chronische elektrische stimulatie) en zal daarom niet substantieel bijdragen aan een verhoging van ongerief voor de dieren. Daarbij zullen de dieren bij deze vorm van uitval waarschijnlijk fysiek gezond zijn, en daarmee nog geschikt zijn voor hergebruik.

In totaal komt dit neer op  $45+20=65$  cavia's.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

#### Vervanging

Vervanging is niet mogelijk aangezien het gehele perifere gehoororgaan inclusief verbinding met de hersenstam (exclusief de haarcellen) via de gehoorzenuw intact en functioneel moet zijn. Natuurlijke degeneratie van dit gehele systeem kan niet *ex vivo* bestudeerd worden.

#### Vermindering

- 1) Het gebruik van *in vivo* bioluminescentie imaging om de stamcellen te detecteren, zal het aantal proefdieren aanzienlijk doen verminderen. Dit is een longitudinale studie en door de *in vivo* detectie van stamcellen, hoeven de dieren pas aan het einde van de experimentele periode opgeofferd te worden, in plaats van na iedere verschillende tijdsperiode. De haalbaarheid van bioluminescentie imaging in cavia's is eerder onderzocht in een studie met kadaverdieren. Deze techniek wordt aangevuld met elektrofysiologie (eCAP-metingen), die eveneens longitudinaal uitgevoerd kunnen worden doordat de cavia's chronisch geïmplantiseerd zullen worden.
- 2) De linkerochlea's dienen als negatieve controles aangezien deze ook hun haarcellen verliezen (doofmaken gebeurt systemisch) en stamceltransplantatie alleen rechts plaatsvindt.
- 3) Voorts is ervoor gekozen om geen normaalhorende controlegroep te gebruiken, omdat vergelijking met functie en aantallen zenuwcellen in de gezonde situatie zal gebeuren met de data van normaalhorende controles uit voorgaande studies.

#### Verfijning - Pijn bestrijding

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties;
- antibiotische profylaxe direct na elke operatie.

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

- 1) Alle chirurgische ingrepen worden onder algehele anesthesie gedaan; post-operatief wordt pijnstilling gegeven.
- 2) De chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw zal voor elk dier een andere drempel hebben voor een gehoorsensatie, maar ook voor het gevoel van pijnlijk hard geluid. De

implanteerbare stimulator is daarom zo ontworpen dat het stimulatie-niveau (stroomsterkte) na implantatie via infraroodcommunicatie op afstand (door de huid) aangepast kan worden. Enerzijds kunnen we dan met behulp van de wekelijkse elektrofysiologische metingen de stroomsterkte instellen op een niveau dat nog net een respons van de zenuw opwekt (ondergrens), en anderzijds kunnen we een maximaal comfortabele stroomsterkte ("maximum comfortable level") als bovengrens instellen. Omdat dit - anders dan bij mensen met een CI - lastig in te schatten is, zullen de cavia's direct na het aanzetten van de chronische elektrische stimulatie goed gecontroleerd (observaties van het gedrag) worden. Schrikreacties bij het aanzetten zijn te verwachten, maar gewenning aan de "nieuwe" gehoorsensatie zal snel moeten optreden, anders is het stimulatie-niveau te hoog.

- 3) Voor de wekelijkse eCAP-metingen is anesthesie niet nodig, omdat uit ruime ervaring is gebleken dat deze metingen niet tot uitingen van schrik/angst/pijn leiden.
- 4) Voor de bioluminescentie-imaging is een lichte narcose voldoende, aangezien de enige vereiste is dat de dieren stilliggen.
- 5) De dieren zullen de eerste twee weken na stamceltransplantatie driemaal per week getemperatuurde worden om een eventueel immunologische reactie op de stamcellen vroegtijdig te kunnen waarnemen en zo nodig te kunnen ondervangen met immunosuppressiva. Echter een significante afstotingsreactie wordt niet verwacht omdat cellen uit haarfollikels zich immunologisch kunnen afschermen (Wang et al. 2015) en eveneens omdat de cavia stamceltransplantaties goed verdraagt (Hildebrand et al. 2005).
- 6) Gedurende de chirurgische ingrepen en het wakker worden zullen de dieren warm gehouden worden op een warmtemat om ongewenste afkoeling te voorkomen.
- 7) Er is gekozen voor vrouwelijke cavia's zodat ze te allen tijde gezamenlijk gehuisvest kunnen worden (zie ook onderdeel B, onderbouwing keuze proefdieren).
- 8) Omdat de stimulator onderhuids geplaatst wordt, kunnen de dieren gedurende de stimulatieperiode vrij bewegen, en hoeven ze niet solitair gehuisvest te worden.

**Referenties:**

Wang X, Hao J, Leung G, Breitkopf T, Wang E, Kwong N, Akhoundsadegh N, Warnock GL, Shapiro J, McElwee KJ (2015) Hair follicle dermal sheath derived cells improve islet allograft survival without systemic immunosuppression. *J Immunol Res* 2015:607328.

Hildebrand MS, Dahl HH, Hardman J, Coleman B, Shepherd RK, de Silva MG (2005) Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolarynol* 6:341-354.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

N.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse



verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

Ja > Worden in dat geval verdooving, 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.

De dieren krijgen:

- preventieve analgesie gevolgd door een tweede dosis 24 uur na elke operatie;
- lokale anesthesie in het operatiegebied;
- algehele anesthesie gedurende de operaties.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) gehoorverlies (bewust geïnduceerd);
- 2) gehoorsensatie door elektrische stimulatie (kan mogelijk onaangenaam zijn);
- 3) evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- 4) infectie na een operatie;
- 5) afstotingsreactie na stamceltransplantatie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

ad 1: bijna volledig gehoorverlies wordt geïnduceerd om de situatie in de dove CI-gebruiker zo goed mogelijk na te bootsen;

ad 2: chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw en stimulatie tijdens het uitvoeren van elektrofysiologische metingen;

ad 3: obstructie van cochleair aquaduct kan endolymfatische hydrops veroorzaken (~1-2% incidentie);

ad 4: risico op infectie tijdens (of vlak na) de operatie (~5% incidentie);

ad 5: mogelijke afstotingsreactie op de lichaamsvreemde stamcellen.

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

ad 1: N.v.t.;

ad 2: door de implanteerbare stimulators uit te rusten met infraroodcommunicatie, kan het stimulatie-niveau op elk moment tijdens de proef aangepast worden (observatie van gedrag, zoals betreffende evenwicht, en elektrofysiologische metingen; zie D);

ad 3: in het zeldzame geval dat dit gebeurt, is euthanasie de enige manier om het lijden weg te nemen;

ad 4: antibiotica na de implantatie vermindert de kans op infectie;

ad 5: in het geval van postoperatieve temperatuurstijging worden immunosuppressiva toegediend.

### 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.

### Humane eindpunten

- progressief gewichtsverlies na doofmaken (gedurende drie dagen >10% gewichtsverlies);
- oorinfectie of infectie rond connector/tandarcement op schedel na cochleaire implantatie;
- zwelling/infectie i.c.m. uittrekking van de stimulator;
- zichtbare evenwichtsproblemen na cochleaire implantatie;
- de dieren zich niet verzorgen (verwarde vacht);
- bij lethargie langer dan 1 dag.

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

Een schatting op basis van voorgaand onderzoek: 10-20%.

### K. Classificatie van ongerief

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

## 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.

De cochlea's moeten worden verwijderd voor histologische analyse

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

#### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2017.I.542.019
2. Titel van het project : Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden
3. Titel van de NTS : Bescherming en herstel van de gehoorzenuw bij doofheid

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 04-08-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 16-08-2017 en 01-11-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 21-08-2017/23-10-2017 en 08-11-2017/17-11-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 27-11-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden:
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 21-08-2017
- Datum antwoord: 23-10-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Algemeen:

- De DEC adviseert u om de aanvraag zo op te schrijven dat duidelijk blijkt dat het om één project gaat (zie ook het document 'Handleiding definitie project' op de website van de CCD).

*Het projectvoorstel is op dit punt aangepast, men name aan de hand van de specifieke punten hieronder.*

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: In het project wordt meerdere keren verwezen naar een 'voorgaande' studie, echter zonder concreet te worden over de resultaten ervan. De DEC zou in het project graag opgenomen zien wat er tot nu toe is gedaan, hoe het huidige project aansluit op het vorige project, of en in hoeverre er overlap is, wat de knelpunten waren, of het vorige project al is afgerond en wat de uitkomsten zijn op basis waarvan u besloten heeft het voorliggende project te starten. Een en ander moet meer inzichtelijk worden gemaakt. De DEC gaat er overigens vanuit dat indien er overlap is tussen beide projecten de dieren die nog in het vorige project zitten niet meer gebruikt zullen worden wanneer u een vergunning heeft voor het voorliggende project.

*Toegevoegd aan Projectvoorstel, Achtergrond, punt 2: "Een deel van deze studie is inmiddels uitgevoerd, en de positieve voorlopige resultaten hebben ertoe geleid dat we met deze aanvraag de studie willen uitbreiden tot een volwaardig vierjaars promotietraject.*

*Voorlopige resultaten laten zien dat de neurotrofe factor BDNF basaal in de cochlea celbehoud biedt, en dat daarbij ook functioneel behoud te zien is. De resultaten met de neurotrofe factor NT-3 zijn nog niet uitgewerkt, al lijkt ook hierbij basaal goede bescherming te zijn. De behandeling met de smallmolecule THF lijkt verrassend genoeg een kleiner beschermend effect te geven dan BDNF. Mede vanwege dit laatste resultaat willen we deze studie uitbreiden, door de farmacokinetiek van de verschillende neurotrofe stoffen in de cochlea en daarbuiten te onderzoeken. Deze lopende studie zal bij goedkeuring van dit project doorgaan onder de nieuwe vergunning. Bij overlap zullen de dieren die nog beschikbaar zijn onder de huidige (oude) vergunning niet meer gebruikt worden."*

*Toegevoegd aan Projectvoorstel, Achtergrond, punt 3: "Onder de huidige vergunning (AVD11500201550) is deze studie opgezet; het technisch complexe studieontwerp is moeilijker gebleken dan vooraf gedacht, maar het is niettemin uitvoerbaar gebleken. Binnen de huidige vergunningsaanvraag willen we daarom deze studie voortzetten.*

*Tot nog toe is in deze studie het diermodel ontwikkeld en verfijnd, evenals de volledig implanteerbare elektrische stimulators. Een van de belangrijkste knelpunten was de complexiteit (en daarmee de duur) van de implantatieprocedures, waardoor de cavia's geregeld wel goed ontwaakten uit de narcose, maar de lange narcoseduur leidde tot problemen enkele dagen later (hoogstwaarschijnlijk het niet meer op gang komen van het spijsverteringsstelsel). De implantaten zijn inmiddels zo aangepast dat implantatie in twee stappen (2 weken uit elkaar) mogelijk is; deze aanpassing heeft ertoe geleid dat nagenoeg*

*alle cavia's de operaties overleven. Een tweede probleem was het materiaal van de stimulators; een biocompatibele coating was nodig om excessieve zwelling tegen te gaan. Er zijn nu meerdere dieren succesvol geïmplant, doof gemaakt, en enkele weken elektrisch gestimuleerd. Analyse van de elektrofysiologische data heeft vooralsnog geen duidelijk effect van de elektrische stimulatie laten zien, maar de histologie lijkt een redelijk celbehoud te laten zien in de gestimuleerde oren ten opzichte van de contralaterale oren. Deze lopende studie zal bij goedkeuring van dit project doorgaan onder de nieuwe vergunning. Deze hernieuwde aanvraag bevat een verzoek om meer proefdieren, omdat zoals hierboven uiteengezet de ontwikkeling en optimalisatie van het experimentele ontwerp langer duurde en complexer was dan vooraf ingeschat. Bij overlap zullen de dieren die nog beschikbaar zijn onder de huidige (oude) vergunning niet meer gebruikt worden."*

- 3.1 Achtergrond: Bij punt 3 is het niet helder waarom u kiest voor het gebruik van BDNF, als eerst (bij punt 2) onderzocht gaat worden welke (combinatie van) neurotrofe factor(en) het meest functioneel is. Graag meer achtergrondinformatie over neurotrofe factoren en over de criteria voor de keuze van specifieke factoren opnemen in het projectvoorstel.

*Toevoeging aan Projectvoorstel 3.1, punt 3: "Een tweede reden om chronische elektrische stimulatie te onderzoeken is omdat het mogelijk is dat het de beschermende werking van neurotrofe factoren versterkt (e.g., Shepherd et al., 2005). Dit versterkende effect zou met name van belang zijn bij klinisch toepasbare (i.e., minimaal invasieve) toedieningsmethoden, waarvan de effectiviteit wellicht minder is dan bij de methoden veelal gebruikt in dierexperimenteel onderzoek (zie ook punt 2 hierboven). Om deze reden zal de neurotrofe factor (of combinatie van neurotrofe factoren) die in dierproef 2 het beste celbehoud oplevert in deze dierproef gecombineerd worden met chronische elektrische stimulatie."*

*In bijlage Dierproef 3 is elke vermelding van BDNF vervangen door het algemenere "neurotrofe factor (NTF)"; aan het begin is toegelicht dat de keuze voor deze NTF gebaseerd zal worden op de uitkomst van dierproef 2: "De keuze voor de neurotrofe factor (NTF) hangt af van dierproef 2, waarin de meest geschikte stof of combinatie van stoffen onderzocht zal worden."*

*In het Projectvoorstel 3.4.3 is bij de beschrijving van dierproef 3 toegevoegd: "Het tweede deel van deze dierproef (neurotrofe behandeling) zal pas gestart worden nadat gebleken is uit dierproef 2 welke (combinatie van) neurotrofe factoren het beste resultaat geeft op het gebied van zowel anatomische en functioneel celbehoud."*

- 3.1 Achtergrond: Bij punt 4 en in bijlage 4 (A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters) geeft u aan dat de stamcellen uit de haarfollikel gehaald worden, maar niet is duidelijk waar die haren vandaan komen. Wordt dit per individueel dier geïsoleerd? En hoe worden de stamcellen vermeerderd? Heeft u dat al eerder gedaan? Is er ooit al een signaal opgepikt? Graag meer informatie en een referentie voor de kweekomstandigheden toevoegen.

*Nb: in het Projectvoorstel 3.1 (Achtergrond, punt 4) is de laatste zin verwijderd, aangezien deze verwees naar de vijfde dierproef en daarom hier overbodig was.*

*Toegevoegd aan Projectvoorstel 3.1 (Achtergrond, punt 4): "De HFBS's zullen geoogst worden uit surplusmuizen; haarfollikels komen uit de snor (de whiskerpad); per haarfollikel is de opbrengst ongeveer 10.000 cellen na 3 passages; per muis kunnen ongeveer 36 haarfollikels geoogst worden; 1 muis is dus meer dan voldoende voor 1 transplantatie. De gehele procedure van oogsten, transfectie, opkweken en beeldvorming in vitro en in vivo wordt beheerst door de afdeling KNO van het LUMC (Gho et al., 2016; Schomann et al., 2016), waarmee dit project in samenwerking zal worden uitgevoerd. Inmiddels heeft een eerste pilot in caviakadavers uitgewezen dat de gehele procedure van kweken tot transplantatie in het binnenoor en bioluminescentie ook in het UMCU succesvol is." Een gedeelte van de voorgaande toevoeging is voor de volledigheid ook toegevoegd aan Bijlage 4, punt A: "De HFBS's zullen geoogst worden uit surplusmuizen; haarfollikels komen uit de snor (de whiskerpad); per haarfollikel is de opbrengst ongeveer 10.000 cellen na 3 passages; per muis kunnen ongeveer 36 haarfollikels geoogst worden; 1 muis is dus meer dan voldoende voor 1 transplantatie. De gehele procedure van oogsten, transfectie, opkweken en beeldvorming in vitro en in vivo wordt beheerst door de afdeling KNO van het LUMC (Gho et al., 2016; Schomann et al., 2016), waarmee dit project in samenwerking zal worden uitgevoerd."*

- 3.1 Achtergrond: Op verschillende plaatsen in het project noemt u vijf punten (3.1, 3.2 en 3.4.4). Die komen echter niet helemaal overeen met elkaar en met wat er in de bijlagen wordt gedaan. Dit wekt verwarring. Zo worden in bijlage 3 ook neurotrofe factoren toegediend en in bijlage 5 stamcellen, maar vermeldt u dit niet consequent, De DEC adviseert u op dit punt consequent te zijn.

*De titel van punt 3 in 3.1 (Achtergrond) is aangepast naar aanleiding van de wijziging van de titel van bijlage 3 (zie commentaar DEC verderop): de neurotrofe behandeling wordt hier nu expliciet genoemd zowel in de titel als in de tekst eronder.*

*De titel van punt 5 in 3.1 (Achtergrond) was blijkbaar verkeerd overgenomen, waardoor stamcellen niet genoemd werden. Dit is nu hersteld: "verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw in combinatie met elektrische stimulatie" → "Verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie". Ook is het nu in de tekst onder het kopje nogmaals expliciet vermeld.*

*Ook in 3.2 (Doel), 3.4.3, en 3.4.4 is dit nu consequent doorgevoerd.*

- 3.4 Onderzoeksstrategie, 3.4.3: Hier geeft u wel aan wat de dierproeven zijn, maar mist de logische samenhang. Dit dient anders opgeschreven te worden. Ook de go/no go momenten en milestones zijn niet duidelijk weergegeven. Het lijkt bijvoorbeeld voor de hand te liggen dat u op basis van resultaten van bijlage 1 kiest voor een bepaalde chirurgische techniek in de rest van het project. Ook lijkt het voor de hand te liggen dat de resultaten van bijlage 2 bepalen welke neurotrofe factor u kiest in bijlage 3. Als er in dit opzicht geen verband is tussen de bijlagen, dan begrijpt de DEC niet goed waarom u dit geheel presenteert als één project. De DEC verwijst u naar het volgende document van

de CCD: <https://www.centralecommissiedierproeven.nl/onderwerpen/handreiking-invulling-definitie-project>.

*Deze sectie is herzien, zoals hieronder puntsgewijs aangegeven. Daarnaast zijn wat algemenere omschrijvingen van de dierproeven verwijderd, of naar de achtergrond verplaatst.*

*De eerste twee alinea's wekten de indruk dat er weinig samenhang was. Dit is echter niet het geval, en daarom is deze sectie grondig herzien: "De logische samenhang van de deelstudies is eerder beschreven (3.1-3.4). In het kort zijn al deze studies erop gericht het horen met een cochleair implantaat te verbeteren. In twee van de deelstudies willen we dit bereiken door (neven-)effecten van klinisch toegepaste cochleaire implantatie beter te begrijpen en in kaart te brengen (1 en 3); de overige deelstudies zijn gericht op de verbetering van de huidige situatie door middel van experimentele interventie. Zoals het schema in 3.4.1 impliceert, zijn de eerste vier dierproeven los van elkaar (i.e., parallel) uit te voeren, ondanks dat de gebruikte technieken (en de achterliggende vraagstelling) in redelijke mate overlappen. Dit is mogelijk doordat de chirurgische, elektrofysiologische en histologische methoden die we zullen gebruiken grotendeels in voorgaande studies ontwikkeld en verfijnd hebben. Enkel in het geval van deelstudie 5 is er een duidelijk "go/no go" moment, zoals hieronder is uitgelegd." → "De vijf dierproeven hebben het gezamenlijke doel cochleaire implantatie bij mensen te verbeteren door (1) de effecten van de aanwezigheid van – en stimulatie met – een intracochleaire elektrodenbundel beter te begrijpen, en (2) degeneratie van de gehoorzenuw als gevolg van zowel doofheid als de insertie/aanwezigheid van de elektrodenbundel tegen te gaan. Hieronder is per dierproef aangegeven in welke mate deze afhangt van (resultaten uit) de andere dierproeven, of van andere onderzoeksresultaten. Globaal zullen eerst dierproeven 2 en 3 (eerste deelstudie) gedaan worden; de hieruit volgende elektrofysiologische resultaten zullen ervoor zorgen dat dierproeven 1 en 4 uitgevoerd kunnen worden, en de histologische resultaten zullen bepalen hoe deelstudie 2 van dierproef 3 uitgevoerd zal worden. Ten slotte zal dierproef 5 pas uitgevoerd worden als dierproeven 3 en 4 succesvol zijn gebleken."*

*Toegevoegd aan dierproef 1: "Omdat uit voorgaand onderzoek is gebleken dat de mate van functionele schade (in tegenstelling tot structurele schade) door insertietrauma lastig te reguleren/kwantificeren is, zullen eerst de functionele effecten van goed reguleerbare ototoxische schade in dierproeven 2 en 3 gekarakteriseerd worden. Hierna zal het naar verwachting gemakkelijker zijn om de wat variabelere mate van schade bij deze dierproef (nr. 1) te identificeren en te relateren aan structurele (anatomische) insertieschade."*

*Toegevoegd aan dierproef 2: "Aan het einde van deze dierproef zal enerzijds naar verwachting een klinische trial met neurotrofe behandeling opgezet worden; anderzijds zal de behandeling die tot het beste behoud leidt, gebruikt worden in deelstudie 2 van dierproef 3."*

*Toegevoegd aan dierproef 3: "Het tweede deel van deze dierproef (neurotrofe behandeling) zal pas gestart worden nadat gebleken is uit dierproef 2 welke (combinatie van) neurotrofe*

*factoren het beste resultaat geeft op het gebied van zowel anatomische en functioneel celbehoud."*

*Toegevoegd aan dierproef 4: "Cruciaal in deze studie is dat naast gangbare methoden om stamcellen te identificeren (bioluminescentie, immunohistochemie) tevens de elektrofysiologie van de cellen in vivo zal worden bestudeerd. Hiertoe zullen de meetmethoden zoals ontwikkeld in dierproeven 2 en 3 gebruikt worden."*

*Naar aanleiding van verschillende van de bovenstaande punten hebben we duidelijker aangegeven waarom de vijf dierproeven één geheel vormen. Waar eerder wellicht meer de verschillen benadrukt werden (om de verschillende invalshoeken te benadrukken), wordt nu meer de onderliggende samenhang benadrukt.*

#### Bijlage 2

- B. De dieren: U noemt hier dat 42 van de 50 dieren in vergelijkbare experimenten in het vorige project gebruikt zijn. De DEC vraagt zich af waarom deze informatie hier is opgenomen.

*Het gaat niet zozeer om vergelijkbare experimenten, maar om een nog lopende studie die bij goedkeuring van de huidige aanvraag zal komen te vervallen. Door aan te geven hoeveel dieren hiervan al zijn gebruikt, geven wij aan hoeveel dieren er nog op de oude vergunning zitten en dus komen te vervallen bij de toekenning van de nieuwe vergunning. Nb: dit valt onzes inziens onder het verzoek eerder (2e punt hierboven; Projectvoorstel) om de relatie met het vorige project te verduidelijken.*

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: De motivatie voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren dient (ook) bij B (de dieren) te worden vermeld.  
*We hebben ervoor gekozen om in B te verwijzen naar de uitgebreidere uitleg in D. Toegevoegd aan 2.B: "Vanwege redenen vermeld in onderdeel D hieronder willen we enkel vrouwelijke cavia's gebruiken."*

#### Bijlage 3

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC raadt u aan om in de titel van de bijlage op te nemen dat het gaat om: de combinatie neurotrofe factor en elektrostimulatie.

*Titel gewijzigd: "Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de gehoorzenuw." → "Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw."*

*In de NTS is een zin toegevoegd aan de beschrijving van dierproef 3: "In deze studie willen we daarnaast onderzoeken of continue elektrische stimulatie het positieve effect van groeifactoren (uit deelstudie 2) kan versterken."*

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Ook hier is het gebruik van BDNF niet onderbouwd.



*Toegevoegd aan 2.A: "De toevoeging van de NTF in deze studie t.o.v. deelstudie 1 is bedoeld om te verifiëren dat ook in de humane situatie (waarbij de gehoorzenuw chronische elektrisch gestimuleerd wordt) de neurotrofe behandeling zoals uitgebreid onderzocht in Dierproef 2 positieve effecten op de gehoorzenuw zal hebben. De verwachting is dat chronische elektrische stimulatie de neurotrofe behandeling niet zal hinderen, of zelfs zal versterken door de combinatie van biochemische en elektrische activatie van de zenuwcellen."*

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Hier zou nog vermeld kunnen worden dat de techniek gebruikt wordt die in bijlage 1 de beste techniek gebleken is. *De elektrode die gebruikt zal worden in dierproef 3 zal sowieso een stuk atraumatischer zijn dan alle elektrodes gebruikt in dierproef 1. In dierproef 1 zullen bewust langere en stijvere elektrodes gebruikt worden dan noodzakelijk, om de kans op schade aan binnenoorstructuren te vergroten.*

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

- Datum vragen: 08-11-2017
- Datum antwoord: 17-11-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:  
Projectvoorstel
  - 3.1 Achtergrond: U geeft aan dat de haarfollikels van muizen afkomstig zijn. Bij de DEC riep dit onmiddellijk vragen op over een mogelijke afweerreactie bij de cavia. Als u reeds de ervaring heeft dat dit werkt (al eerder gedaan?), dan is het aan te bevelen dat te vermelden? Waarom is het gebruik van haarfollikels van de cavia niet mogelijk? Graag toelichten.  
*Een toelichting is opgenomen in het projectvoorstel.*
  - 3.1 Achtergrond: Daarnaast gaat de DEC er vanuit dat de surplus muizen waar de follikels van afkomstig zijn, aangevraagd zijn op een al lopend project of reeds voor een ander doel dan dit project zijn gedood. Mocht dat niet het geval zijn, dan dient u de dieren in dit project aan te vragen. Graag nog verhelderen.  
*Een toelichting is opgenomen in het projectvoorstel.*
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud):**

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. De huidige projectaanvraag heeft als doelstelling het verrichten van fundamenteel en toegepast onderzoek naar het beschermen en het beter laten functioneren van de gehoorzenuw bij doofheid. Veel gevallen van doofheid worden veroorzaakt door de afwezigheid van haarcellen in het binnenoer (cochlea). In dat geval kan een cochleair implantaat de gehoorzenuw elektrisch stimuleren zodat men weer kan horen. Echter, in 20% van de gevallen is het gehoor via het cochleaire implantaat niet optimaal. Het is onduidelijk waarom deze groep dove mensen geen of weinig baat heeft bij het cochleaire implantaat. Tegenwoordig worden er verschillende typen cochleaire implantaten gebruikt welke op verschillende manieren in het binnenoer worden gebracht. De voor en nadelen van deze verschillende technieken zijn nog steeds onduidelijk. De conditie van de gehoorzenuw is cruciaal voor de functionele link van het cochleaire implantaat en het brein om het geluid te kunnen interpreteren. In dit onderzoeksproject worden experimentele studies uitgevoerd met verschillende onderzoeks- en interventietechnieken welke zijn verdeeld over een vijftal bijlagen. In de afgelopen jaren heeft de onderzoeksgroep de nu toe te passen onderzoekstechnieken geoptimaliseerd onder eerdere vergunningen. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 1 uit de "Handreiking Invulling Definitie Project". De benodigde experimentele dierproeven zijn zeer helder uitgewerkt. In de eerste bijlage wordt onderzocht welk type cochleair implantaat en welke manier van implantatie het minste schade aan het midden- en binnenoer veroorzaakt. In de tweede bijlage wordt onderzoek gedaan naar de mogelijk gunstige effecten van drie typen neurotrofe stoffen welke tot een beter behoud van de gehoorzenuw zouden kunnen leiden. De neurotrofe stof met de meest positieve effecten op de gehoorzenuw zal in de derde bijlage worden gebruikt om te onderzoeken of chronische elektrische stimulatie en de neurotrofe behandeling een synergetisch effect hebben. In de vierde bijlage zal worden onderzocht of het inbrengen van stamcellen uit haarfollikels kan resulteren in een betere morfologie en functie van de gehoorzenuw. Wanneer de experimenten beschreven in de derde en vierde bijlagen goed zijn verlopen, zal tenslotte in de vijfde bijlage worden onderzocht wat het effect is van het combineren van het inbrengen van stamcellen en chronisch elektrische stimulatie op de functionaliteit van de gehoorzenuw. Het is helder welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondervinden. De DEC is er om die reden van overtuigd dat het project toetsbaar is.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling.

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is om door middel van verschillende technieken de nog bestaande spirale ganglioncellen van de gehoorzenuw te behouden en te beschermen tegen degeneratie. Het uiteindelijke doel van het project is om patiënten met doofheid welke geen of onvoldoende verbetering van het gehoor ervaren van het cochleaire implantaat, wél een significante verbetering van het gehoor te laten ervaren (ofwel de gehoorzenuw optimaal te laten functioneren). Daartoe worden er in dit project ook een aantal mogelijke behandelingen getoetst (o.a. aanbrengen van gelfoam voorzien van neurotrofe factoren of stamcellen uit haar in de cochlea). Voordat een dergelijke behandelmethode in mensen toegepast kan worden is het van belang dat in dierexperimenten aannemelijk is gemaakt dat de beschreven technieken veilig zijn en goed werken. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de (toekomstige) patiënten.

Dit onderzoek is in de eerste plaats van belang voor (toekomstige) patiënten. Steeds meer dove en slechthorende mensen komen in aanmerking voor een cochleair implantaat. Mensen met ernstig gehoorverlies kunnen vaak niet meer volledig functioneren op de arbeidsmarkt en in het sociale leven en kunnen mede daardoor in een sociaal isolement raken. Wanneer deze mensen goed geholpen kunnen worden met een cochleair implantaat, verhoogt dit aanzienlijk de kwaliteit van leven. Niet iedere patiënt ervaart echter een wezenlijke verbetering van het gehoor na de implantatie van een cochleair implantaat. In dit project worden er meerdere onderzoeken verricht om te achterhalen wat hier de oorzaken van kunnen zijn. Bovendien is voor de werking van het cochleair implantaat het correct functioneren van de gehoorzenuw van groot belang. Daarom zullen in dit project ook een aantal mogelijke behandelmethoden worden getoetst welke ervoor zorgen dat de gehoorzenuw optimaal blijft functioneren.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en zullen gedurende de proeven met opzet doof gemaakt worden, stress ondervinden en pijn ervaren. De dieren zullen in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Voor de onderzoekers geldt dat dit project kan bijdragen aan nieuwe wetenschappelijke inzichten, een goede wetenschappelijke reputatie en wellicht leidt te opgedane kennis tot een product dat uiteindelijk op de markt gebracht kan worden. Wetenschappelijke reputatie kan door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

*Proefopzet en haalbaarheid*

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden. Het nu ingediende project is onderdeel van een onderzoek dat inmiddels 15 jaar gaande is. Daardoor heeft de onderzoeksgroep jarenlange ervaring met vrijwel alle technieken die voor deze projectaanvraag noodzakelijk zijn. Het materiaal en het ontwerp voor de chronische elektrische stimulator, de implantatietechniek en de gelfoam met daarin neurotrofe stoffen zijn inmiddels met succes getest. De insertie techniek van de elektronenbundel is al voor deze projectaanvraag geoefend op humane kadavermodellen.. Nieuw in dit project is het gebruik van stamcellen uit haarfollikels. De onderzoekers geven aan dat zij hiervoor samenwerken met een andere onderzoeksgroep die de hele procedure van het oogsten, de transfectie, het opkweken en de beeldvorming van de stamcellen beheerst. Een eerste pilot in caviakadavers heeft uitgewezen dat de gehele procedure van kweken tot transplantatie in het binnenoor en bioluminescentie om de stamcellen te visualiseren ook succesvol is bij de nu aanvragende onderzoeksgroep. De DEC is wel enigszins sceptisch ten aanzien van het stamcelonderzoek omdat nog niet duidelijk is of deze stamcellen in levend weefsel worden geaccepteerd en zullen differentiëren in de gewenste cellen. Gezien echter de duidelijke go/no-go stappen in het het stamcelonderzoek, en de onderzoekers de overige onderzoeksmethoden uitstekend beheersen, is de DEC ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat te veel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. In vrijwel alle beschreven experimenten worden de cavia's twee weken voorafgaand aan de verschillende experimentele behandelmethoden eenzijdig doof gemaakt door middel van het inspuiten van de farmacologische stof furosemide in de rechter vena jugularis externa onder volledige anaesthesie. In de meeste experimenten wordt er een cochleair implantaat onder volledige anaesthesie geplaatst en vast gemaakt aan de schedel. Met het cochleaire implantaat (geïmplanteerde elektroden) en de schroeven op de schedel kunnen hersenstam metingen en elektrofyysiologische metingen worden verricht (gedurende 30-90 minuten per keer). Voor deze metingen wordt een commercieel humaan cochleair implantaat aangesloten en worden er wekelijks kliks en tonen aan het dier gepresenteerd in wakkere conditie. In bijlage 2 en 3 zal er een gelfoam met neurotrofe stoffen worden geplaatst voor het ronde venster van de cochlea. In bijlage 3 en 5 krijgen de cavia's een additionele operatie onder volledige anaesthesie waarbij

een stimulator in de linkerflank wordt geplaatst welke middels elektrodendraad wordt verbonden met het cochleaire implantaat. Deze stimulator is noodzakelijk om de effecten te meten van chronische stimulatie middels het cochleair implantaat. In bijlage 4 en 5 zullen de cavia's genetisch gemanipuleerde, bioluminescerende haarfollikel stamcellen in de cochlea geplaatst krijgen. Iedere cavia ondergaat in het rechteroor de experimentele handelingen en het linkeroor dient als controle oor. De duur van het gehele experiment is 31 tot 77 dagen voor alle dieren. De primaire uitkomstparameters voor het functioneren van het gehoor zijn de reacties vanuit de hersenstam en de geïmplanteerde elektroden. In het geval van de gelfoam studies wordt onderzocht of de neurotrofe stoffen meetbaar zijn in cochleaire vloeistof en in de hersenventrikelvloeistof; direct hierna wordt het dier gedood. In het geval van de stamcelstudies wordt gekeken naar het aantal en de ontwikkeling van de stamcellen. Alle cavia's worden gedood om histologische metingen te verrichten waarin het aantal haarcellen, spinale ganglioncellen (zenuwcellen), perifere uitlopers en de morfologie van de spinale ganglioncellen wordt onderzocht.

De fasering van het uitvoeren van de experimenten in de bijlagen is als volgt. Omdat uit voorgaand onderzoek is gebleken dat de mate van functionele schade (in tegenstelling tot structurele schade) door insertietrauma lastig te reguleren/kwantificeren is, zullen eerst de functionele effecten van goed reguleerbare ototoxische schade in bijlage 2 en 3 gekarakteriseerd worden. Hierna zal het naar verwachting gemakkelijker zijn om de wat variabelere mate van schade bij de studies in bijlage 1 te identificeren en te relateren aan structurele (anatomische) insertieschade. Het tweede deel van bijlage 3 (neurotrofe behandeling) zal pas gestart worden nadat gebleken is uit bijlage 2 welke (combinatie van) neurotrofe factoren het beste resultaat geeft op het gebied van zowel anatomisch als functioneel celbehoud. Vervolgens worden de experimenten in bijlage 1 en 4 uitgevoerd. De experimenten beschreven in de vijfde bijlage (combinatie stamceltherapie en chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw) van het project zullen pas worden gestart (go/no-go) wanneer de experimenten beschreven in de derde (chronische elektrische stimulatie) en vierde (stamceltherapie) bijlage van het project succesvol zijn verlopen en er geen negatieve effecten van de behandelingen zijn gevonden.

#### *Welzijn dieren*

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
  - Niet-menselijke primaten (10e)
  - Dieren in/uit het wild (10f)
  - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
  - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De onderzoekers verwachten in een looptijd van vijf jaar maximaal 596 vrouwelijke cavia's te gebruiken waarvan in totaal 99% van de cavia's matig ongerief zullen ondervinden en 1% licht ongerief (de positieve controle groep van n=8 uit bijlage 2). Vrijwel ieder dier ondergaat 1-2 operaties wat matig ongerief met zich mee brengt. Een overzicht van het aantal percentage dieren wat de volgende experimentele handelingen ondergaat:
  - 1) Doof maken van de dieren: 66% van 106 dieren in bijlage 1, 97% van 265 dieren in bijlage 2, 100% van 100 dieren in bijlage 3, 100% van 60 dieren in bijlage 4, 100% van 65 dieren in bijlage 5.
  - 2) Cochleaire implantatie: 100% van 106 dieren in bijlage 1, 100% van de 100 dieren voor bijlage 3, 66% van 60 dieren in bijlage 4, 66% van 65 dieren in bijlage 5.
  - 3) Plaatsen van gelfoam: 94% van 265 dieren in bijlage 2, 50% van 100 dieren in bijlage 3.
  - 4) Plaatsen stimulator: 83% van 100 dieren in bijlage 3, 66% van 65 dieren in bijlage 5.
  - 5) Chronische stimulatie: 83% van 100 dieren in bijlage 3.
  - 6) Injecteren stamcellen: 66% van 60 dieren in bijlage 4, 66% van 65 dieren in bijlage 5.
  - 7) Wekelijks bioluminescentie beeldvorming onder lichte anaesthesie: 66% van 60 dieren in bijlage 4, 66% van 65 dieren in bijlage 5.
  - 8) Elektrofysiologische metingen in wakkere conditie: 100% van 106 dieren in bijlage 1, 83% van 100 in bijlage 3, 66% van 60 dieren in bijlage 4, 66% van 65 dieren in bijlage 5.
12. De integriteit van de dieren wordt in fysiek opzicht aangetast door het doof maken van de dieren en doordat de dieren een implantatie krijgen van een cochleair implantaat, een stimulator, stamcellen en gelfoam. De dieren worden mentaal of gedragsmatig opzicht aangetast omdat de dieren pijn zouden kunnen ervaren in de eerste dagen na de operaties. De dieren kunnen mogelijk een onaangename gehoorsensatie hebben door de elektrische stimulatie. De dieren kunnen problemen met het evenwicht ervaren als bijwerking van het doof maken of het plaatsen van een cochleair implantaat. Complicaties die kunnen optreden na de insertie van het cochleair implantaat zijn 1) evenwichtsproblemen door obstructie van het cochleaire aquaduct (incidentie 1-2%), 2) infectie tijdens of na de operatie ( incidentie 5%).
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De dieren zullen worden ge-euthanaseerd: indien het dier gedurende drie dagen meer dan 10% in gewicht afneemt, indien er een oorinfectie of een infectie rondom de connector of het tandartsceement op de schedel na de cochleaire implantatie zichtbaar is, indien er zichtbare evenwichtsproblemen zijn na de cochleaire implantatie, indien er een zwelling en/of infectie is



rondom de stimulator en de stimulator hierdoor uittreedt, indien de dieren zich niet verzorgen (verwarde vacht) of indien de dieren lethargie laten zien welke langer aanhoudt dan één dag. Op basis van voorafgaand onderzoek wordt ingeschat dat, over alle bijlagen gezien, 5-20% van de dieren het humaan eindpunt zullen bereiken.

### 3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De experimenten betreffende de beperking van de schade als gevolg van de insertie van het cochleaire implantaat is onderdeel van een grotere studie met materiaal afkomstig van overleden patiënten (rotsbeenderen inclusief de cochlea). Voorafgaand aan de dierexperimenten zullen in deze humane kadaverbeenderen insertietechnieken geleerd worden en zal kennis vergaard worden over de specifiek acuut mechanische trauma's die op kunnen treden. De haalbaarheid van bioluminescentie imaging in cavia's is eerder onderzocht in een studie met kadaverdieren. Vervanging van de dierexperimentele studies is niet mogelijk aangezien het gehele perifere gehoororgaan inclusief de verbinding met de hersenstam via de gehoorzenuw intact en functioneel moet zijn. De beschreven proeven kunnen niet in mensen worden uitgevoerd omdat de te gebruiken geneesmiddelen niet goedgekeurd zijn voor humaan gebruik en er geen histologische analyse mogelijk is bij mensen.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door gebruik te maken van chronische implantaten kunnen aan dezelfde dieren meerdere keren metingen gedaan worden. Doordat de niet-geïmplanteerde linker cochlea's van elk dier gebruikt zullen worden als 'within-subject controle' zijn er geen controle groepen nodig. Er wordt gebruik gemaakt van de elektrofysiologische en histologische gegevens van normaalhorende cavia's uit voorgaande proeven als positieve controle. In bijlage 2 zal de bepaling van de neurotrofe stoffen in de cochleaire vloeistof en de hersenvloeistof, na het plaatsen van de gelfoam, eerst worden uitgevoerd in groepen dieren waarbij de bepaling wordt gedaan 4 uur na het plaatsen van de gelfoam. Wanneer er op een bepaald tijdstip geen detectie meer mogelijk is, hoeven de groepen met een langere tijdsduur tussen het plaatsen van de gelfoam en de detectie van de neurotrofe stoffen in de cochlea en hersenvloeistof niet meer te worden uitgevoerd. Door het gebruik van *in vivo* bioluminescentie imaging kunnen de stamcellen longitudinaal worden gedetecteerd in bijlage 4 en 5. Hierdoor zijn minder proefdieren nodig omdat de dieren pas aan het einde van de experimentele periode gedood zullen worden, in plaats van na iedere tussenliggende tijdsperiode.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. In gehooronderzoek wordt de cavia veel gebruikt, wat vergelijking met de literatuur mogelijk maakt. Voor deze studies is de cavia het meest geschikte diermodel omdat bij de cavia het



binnenoor eenvoudig te bereiken is en het binnenoor redelijk overeenkomt met dat van de mens. Om de uniformiteit tussen dieren zo groot mogelijk te houden worden jong volwassen cavia's gebruikt omdat er op jongere leeftijd nog minimale "natuurlijke" schade aan het gehoor is en omdat het ototoxische effect van de farmacologische stoffen welke worden gebruikt om de cavia doof te maken op latere leeftijd minder groot is. In dit project worden uitsluitend vrouwelijke cavia's gebruikt omdat ze, in tegenstelling tot mannelijke dieren langdurig gezamenlijk gehuisvest kunnen worden. Uit voorgaande experimenten is gebleken dat de dieren geen schrik/angst/pijn tonen bij de wekelijkste elektrofysiologische metingen, en deze kunnen daarom zonder anaesthesie worden uitgevoerd. De te gebruiken neurotrofe stoffen, en hoe zij zich bewegen in de cochlea kan worden gemodelleerd *in silico* en kan daardoor een richtlijn geven tot een goed tijdstip om een meting te verrichten. De implanteerbare stimulator is zo ontworpen dat het stimulatie-niveau (stroomsterkte) na implantatie via infraroodcommunicatie op afstand (door de huid) aangepast kan worden. Dit heeft als voordeel dat de chronische elektrische stimulatie van de gehoorzenuw voor elk dier individueel kan worden afgestemd op de meest ideale sterkte (niet te hard om geen schrikreactie op te wekken, maar zodanig dat nog net een respons van de zenuw opgewekt kan worden). Omdat de stimulator onderhuids geplaatst wordt, kunnen de dieren gedurende de stimulatieperiode vrij bewegen, en hoeven ze niet solitair gehuisvest te worden. De dieren zullen de eerste twee weken na stamceltransplantatie driemaal per week getemperatuurd worden om een eventueel immunologische reactie op de stamcellen vroegtijdig te kunnen waarnemen en zo nodig te kunnen ondervangen met immunosuppressiva.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

*Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef*

18. Er zullen alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden omdat deze dieren te allen tijde gezamenlijk kunnen worden gehuisvest. Vrouwelijke cavia's zijn rustiger dan mannetjes en er bestaat de mogelijkheid dat wanneer de cavia's geïmplanteed zijn, de mannetjes aan de externe delen van elkaars implantaten zitten. Uit ervaring weten we dat mannetjes eerder aan elkaars hechtingen/implantaten zitten en zo het risico op wondinfecties of beschadigingen vergroten. Er zijn veel eerdere proeven gedaan met vrouwelijke cavia's; dit maakt dat de resultaten onderling vergelijkbaar en gebruik van data onderling verwisselbaar. Dit maakt dat er in totaal minder proefdieren nodig zijn. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren, en met zo min mogelijk ongerief voor de dieren, te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood omdat de post-mortem weefsels uitgebreid moeten worden geanalyseerd om de onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.

20. Omdat in het projectvoorstel cavia's worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

#### NTS

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

#### **D. Ethische afweging**

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het doel van het project, waarin gezocht wordt naar methoden om de gehoorzenuw/cochleaire ganglioncellen in de cochlea optimaal te laten functioneren, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de te gebruiken proefdieren (maximaal 596) plaats, met 99% matig en 1% licht ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project er toe bijdragen dat de keuze voor het type cochleair implantaat en de manier van inbrengen wetenschappelijk onderbouwd is en dat de resultaten volgend uit dit project kunnen resulteren in mogelijke behandelingen in de toekomst om de gehoorzenuw beter te laten functioneren zodat het cochleair implantaat beter zijn werk kan doen. Volgens de Wereldgezondheidsorganisatie lijdt meer dan 5% van de bevolking aan gehoorverlies. Bij substantieel haarcelverlies in de cochlea is enkel het plaatsen van een cochleair implantaat een mogelijkheid om nog te kunnen horen. Echter, in 20% van de gevallen ervaart men na de implantatie geen optimale verbetering van het gehoor. Dit resulteert o.a. in verminderd welzijn en het niet meer participeren in de arbeidsmarkt. Momenteel is het onbekend waarom in 20% van de gevallen er geen optimale verbetering van het gehoor plaatsvindt. In dit project wordt gekeken naar de mogelijke oorzaken en eventuele behandelmethoden. De DEC is van mening dat door de nauwe samenwerking met de kliniek de translatie van de bevindingen in proefdieren naar humane toepassingen mogelijk is. De experimenten beschreven in bijlage 1 zijn een wisselwerking tussen dierexperimenteel en humaan (postmortem) onderzoek. Daarnaast wordt er een klinische trial opgezet waarin dove patiënten met neurotrofe factoren behandeld zullen worden. De onderzoeksgroep is erg ervaren en gebruikt innovatieve technieken. Gezien de complexiteit van de operaties en de implantaties in bijlage 3-5 wordt een substantiële percentage uitval verwacht (30%). Op basis van de beschrijvingen van de onderzoekers gaat de DEC er van uit dat deze uitval niet gepaard gaat met additioneel ongerief, omdat de uitval voornamelijk komt door technische problemen. De dieren zijn daardoor meestal fysiek gezond en zouden voor hergebruik in andere studies ingezet kunnen worden. Het is aannemelijk dat de fundamentele/translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk. De DEC is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel het identificeren van mogelijke methoden en behandelingen voor een verbeterde functie van het gehoor bij een cochleair implantaat een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee 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 vergunningplichtig 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 geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020174315  
**Bijlagen**  
2

Datum 8 december 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 6 december 2017. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020174315. 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**  
8 december 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020174315

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum:**  
8 december 2017  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020174315

### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

**Deelnemersnummer NVWA:** 11500  
**Naam instelling of organisatie:** UMC Utrecht  
**Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:** [REDACTED]  
**Postbus:** 12007  
**Postcode en plaats:** 3501 AA UTRECHT

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

**Naam:** [REDACTED]  
**Functie:** onderzoeker  
**Afdeling:** Keel-, Neus-, en Oorheelkunde  
**Telefoonnummer:** [REDACTED]  
**E-mailadres:** [REDACTED]

#### Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

**Naam:** [REDACTED]  
**Functie:** onderzoeker  
**Afdeling:** Keel-, Neus-, en Oorheelkunde  
**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

**Datum:**

8 december 2017

**Aanvraagnummer:**

150020174315

**Over uw project**

Geplande startdatum:

1 februari 2018

Geplande einddatum:

31 januari 2023

Titel project:

Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden

Titel niet-technische samenvatting:

Bescherming en herstel van de gehoorzenuw bij doofheid

Naam DEC:

DEC Utrecht

Postadres DEC:

Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC:

dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.827,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

 DEC-advies**Ondertekening**

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Utrecht

Datum:

4 december 2017





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020174315  
**Bijlagen**  
2

Datum 8 december 2017  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

### Factuur

Factuurdatum: 8 december 2017  
Vervaldatum: 7 januari 2018  
Factuurnummer: 174315  
Ordernummer: o.v.v. CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020174315	€ 1.827,00

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.

**From:** info@zbo-ccd.nl  
**To:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
**Cc:** [REDACTED]  
**Subject:** Aanhouden AVD1150020174315  
**Date:** dinsdag 23 januari 2018 15:48:34

---

Geachte [REDACTED]

Op 06-12-2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden" met aanvraagnummer AVD1150020174315. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In dit bericht leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Welke informatie nog nodig**

Wij hebben de volgende informatie van u nodig om uw aanvraag verder te kunnen beoordelen:

#### **Niet technische samenvatting**

De NTS is erg lang en zou bij voorkeur niet meer dan 500 woorden mogen bevatten. Kunt u daarnaast het woord 'cochlea' uitleggen of anders benoemen? Kunt u een aangepaste, kortere, NTS sturen?

Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

#### **Opsturen binnen veertien dagen**

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

#### **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.

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,  
Namens de Centrale Commissie Dierproeven

[REDACTED]  
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD1150020174315  
**Bijlagen**  
1

Datum 5 februari 2018

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 6 december 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden" met aanvraagnummer AVD1150020174315. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a lid 1 van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet).

U kunt met uw project starten. De vergunning wordt afgegeven van 5 februari 2018 tot en met 31 januari 2023.

De onderbouwing van deze beslissing vindt u onder 'Overwegingen'.

### **Procedure**

#### *Advies dierexperimentencommissie*

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie (DEC) DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is ontvangen op 6 december 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Het advies van de DEC is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Datum:**  
5 februari 2018  
**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020174315

*Nadere vragen aanvrager*

Op 23 januari 2018 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. De aanvullingen hadden betrekking op een nieuwe, kortere, NTS. Uw antwoord is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

**Overwegingen**

Alle hierboven genoemde stukken liggen ten grondslag aan ons besluit.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de DEC, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

**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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum:**

5 februari 2018

**Aanvraagnummer:**

AVD1150020174315

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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



# Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 5 februari 2018 tot en met 31 januari 2023, voor het project "Bescherming en herstel van de gehoorzenuw ten behoeve van effectieve cochleaire implantatie bij doven en ernstig slechthorenden" met aanvraagnummer AVD1150020174315, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is onderzoeker.  
Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 6 december 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 28 november 2017;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.4.1 Beperking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel, zoals ontvangen op 28 november 2017;
    - 3.4.4.2 Neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw, zoals ontvangen op 28 november 2017;
    - 3.4.4.3 Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw, zoals ontvangen op 28 november 2017;
    - 3.4.4.4 Herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie, zoals ontvangen op 28 november 2017;
    - 3.4.4.5 Verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie, zoals ontvangen op 28 november 2017;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 30 januari 2018;
  - d Advies van Dierexperimentencommissie zoals ontvangen op 6 december 2017
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 30 januari 2017.

Aanvraagnummer:  
AVD1150020174315

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Overige opmerkingen
<b>3.4.4.1 Beperking van trauma ten gevolge van insertie van de elektrodenbundel</b>				
	Cavia's (Cavia porcellus)	106	Matig	
<b>3.4.4.2 Neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw</b>				Een deel van de experimenten van studie 2 is al gestart (AVD11500201550) en zal nu geheel onder onderliggende vergunning vallen.
	Cavia's (Cavia porcellus)	265	97,0% Matig 3,0% Licht	
<b>3.4.4.3 Effecten van chronische implantatie en chronische elektrische stimulatie op de neuroprotectieve werking van neurotrofe behandeling van de gehoorzenuw</b>				
	Cavia's (Cavia porcellus)	100	Matig	
<b>3.4.4.4 Herstel van de gehoorzenuw door middel van stamceltherapie</b>				
	Cavia's (Cavia porcellus)	60	Matig	
<b>3.4.4.5 Verbetering van de functionaliteit van de gehoorzenuw met een combinatie van stamcellen en elektrische stimulatie</b>				
	Cavia's (Cavia porcellus)	65	Matig	

*Ter informatie*

Onderstaande informatie is opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.



**Aanvraagnummer:**

AVD1150020174315

- Go/ no go momenten worden voor aanvang van elk experiment afgestemd met de IvD.
- Het is verboden 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.
- Het is verboden dierproeven te verrichten voor een doel waarvan het belang niet opweegt tegen het ongerief dat aan het proefdier wordt berokkend.
- Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.



**Aanvraagnummer:**  
AVD1150020174315

## 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:**

AVD1150020174315

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

**Einde van een dierproef**

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

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

Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

In artikel 13c is vastgesteld dat proefdieren geadopteerd kunnen worden, teruggeplaatst in hun habitat of in een geschikt dierhouderijsysteem, als de gezondheidstoestand van het dier het toelaat, er geen gevaar is voor volksgezondheid, diergezondheid of milieu en er passende maatregelen zijn genomen om het welzijn van het dier te waarborgen.

