

	<b>Dossier: AVD11500202418278</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>X</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>X</b>
<b>7</b>	<b>Beschikking en vergunning</b>	<b>X</b>

## NIET-TECHNISCHE PROJECTSAMENVATTING

Naam van het project	Bescherming van gehoor en behandeling van gehoorverlies
NTS-identificatiecode	NTS-NL-412220 v.1, 21-10-2024
Land	Nederland
Taal	nl
Duur van het project, uitgedrukt in maanden.	60
Trefwoorden	Gehoorverlies Schadelijke bijwerking Muis Chemotherapie Antibiotica
Doel(en) van het project	Fundamenteel onderzoek: Zintuigorganen (huid, ogen en oren)

### DOELSTELLINGEN EN VERWACHTE VOORDELEN VAN HET PROJECT

<p>Beschrijf de doelstellingen van het project (bijvoorbeeld het aanpakken van bepaalde wetenschappelijke onduidelijkheden, of wetenschappelijke of klinische behoeften).</p>	<p>In het oor zijn de haarcellen de belangrijke cellen die we nodig hebben om te kunnen horen. De cellen worden zo genoemd vanwege de haartjes (cilia) op de cel. De haarcellen bevinden zich in het slakkenhuis, het gehoororgaan. Slechthorendheid wordt vaak veroorzaakt door schade aan de haarcellen en verlies ervan. Schade aan de haarcellen, bijvoorbeeld geknakte of verwarde haartjes, leidt tot gehoorverlies, en verlies van haarcellen leidt tot ernstig gehoorverlies. Het uiteindelijke doel van dit project is om de haarcellen te beschermen tegen aanvallen (negatieve bijwerkingen) van geneesmiddelen die bedoeld zijn om te genezen van bepaalde ziekten (zoals tuberculose en kanker) en ook om schade aan haarcellen te herstellen. In dit project richten we ons op twee soorten geneesmiddelen met voor het gehoor schadelijke bijwerkingen: antibiotica (kanamycine) en chemotherapie (cisplatine).</p> <p>Het project heeft twee doelstellingen. Ten eerste willen we onderzoeken op welke manieren de kanamycine en cisplatine de haarcellen beschadigen. Er zijn aanwijzingen in de wetenschappelijke literatuur dat zogenaamde bioactieve lipiden, vetachtige stofjes, daarbij een rol spelen. We willen met name kijken naar die lipiden. Als we beter snappen hoe de lipiden zich bemoeien met hoe kanamycine en cisplatine de haarcellen beschadigen, willen we ten tweede de lipiden gebruiken om een geneesmiddel te maken dat voorkomt dat kanamycine en cisplatine de haarcellen beschadigen.</p>
<p>Welke potentiële voordelen kan dit project opleveren? Leg uit hoe de wetenschap vooruit kan worden geholpen of mensen, dieren of het milieu uiteindelijk voordeel kunnen hebben bij het project. Maak, waar van toepassing, een onderscheid tussen voordelen op korte termijn (binnen de looptijd van het project) en voordelen op lange termijn (die mogelijk pas worden bereikt nadat het project is afgerond).</p>	<p>Op korte termijn zijn er potentiële voordelen voor de wetenschap van het gehoor. Het project kan inzichten geven en kennis verschaffen over hoe kanamycine en cisplatine (en vergelijkbare geneesmiddelen met voor het gehoor negatieve bijwerkingen) de haarcellen beschadigen. De benadering met lipiden is relatief nieuw voor de wetenschap, en het is vooral interessant om te zien hoe cruciaal de rol van lipiden is. Er is kans op inzichten waar andere wetenschappers op kunnen inhaken. Op lange termijn hopen we dat het project voordelen oplevert voor onze samenleving door het terugdringen van het aantal mensen met ernstig gehoorverlies. Een bijzondere groep hierbij zijn de kinderen met kanker die behandeld worden met cisplatine en na overleving een mindere kwaliteit van leven hebben vanwege gehoorverlies. We zien kansen om dit gehoorverlies te voorkomen door rond de cisplatine-behandeling een geneesmiddel te geven dat de bijwerking tegengaat. Dit geneesmiddel zou op lange termijn gemaakt kunnen worden op grond van de resultaten van ons project.</p>

## VOORSPELDE SCHADE

<p>In welke procedures worden de dieren gewoonlijk gebruikt (bijvoorbeeld injecties, chirurgische procedures)? Vermeld het aantal en de duur van deze procedures.</p>	<p>a) Meten van gehoorfunctie. Elektrische signalen van de gehoorzenuw en hersenstam worden gemeten in reactie op korte klikjes en toontjes (auditory brainstem responses, ABRs) om de gehoorfunctie te bepalen (vergelijkbaar met ECG of EEG). De muizen worden daarvoor verdoofd en drie naalden om de ABR mee te meten (zogenaamde elektroden) worden in de huid aangebracht (achter de oorschelp, op het hoofd en in de achterpoot). De duur van de metingen is 15 tot 30 minuten. De ABR-metingen worden tijdens de duur van het experiment drie keer uitgevoerd.</p> <p>b) Aanbrengen van gehoorverlies. Het gehoor wordt beschadigd door de dieren bloot te stellen aan medicatie met negatieve bijwerkingen voor het gehoor, kanamycine of cisplatine. De procedure is eenmalig voor kanamycine en de procedure wordt op maximaal drie achtereenvolgende dagen uitgevoerd met cisplatine. Het gehoorverlies zal permanent zijn. Na de ABR-metingen wordt de medicatie toegediend terwijl de dieren onder verdoving blijven. Het antibioticum kanamycine wordt onderhuids toegediend en daarna wordt het plasmiddel furosemide via de ader toegediend. Cisplatine wordt in de buikholte toegediend nadat furosemide via de ader of in de buikholte is toegediend. Furosemide wordt toegediend om het effect van kanamycine dan wel cisplatine te versterken, wat schade aan andere organen beperkt, en wat de benodigde dosis en het aantal toedieningen beperkt, en daarmee het ongerief beperkt.</p> <p>c) Lokale toediening van stoffen in het slakkenhuis. Stoffen die geschikt lijken om de schade van kanamycine of cisplatine te voorkomen, worden in het slakkenhuis aangebracht tijdens een operatie onder verdoving. We doen dit een dag voor de behandeling met kanamycine of cisplatine. Na de operatie worden de dieren dagelijks geobserveerd en wordt pijnstilling gegeven tot in elk geval de operatiewond is genezen.</p> <p>d) Doden. De dieren worden gedood door ze te plaatsen in een CO2-hok, waardoor ze stikken door zuurstofgebrek.</p>																
<p>Wat zijn de verwachte gevolgen/nadelige effecten voor de dieren, bijvoorbeeld pijn, gewichtsverlies, inactiviteit/verminderde mobiliteit, stress, abnormaal gedrag, en wat is de duur van die effecten?</p>	<p>Aangezien furosemide een plasmiddel is, verliezen de dieren veel vocht en is er vaak gewichtsverlies in de eerste drie dagen. Om die reden meten we in die dagen dagelijks het gewicht en houden we het welzijn in de gaten door te kijken naar de vacht en naar het gedrag.</p> <p>Zeer zelden (&lt; 1%) overlijdt het dier door de combinatie van kanamycine en furosemide. Cisplatine heeft een aantal mogelijke bijwerkingen op nieren, spieren en zenuwstelsel.</p> <p>Stress kan optreden wegens het gehoorverlies en daarbij vaak optredend oorsuizen. Het ongerief wordt ingeschat op matig.</p> <p>De operatie waarbij de stoffen worden toegediend in het slakkenhuis vindt plaats onder verdoving. De dieren kunnen na de operatie pijn ondervinden als gevolg van de wond. De dieren krijgen pijnstillende medicatie. Het ongerief wordt ingeschat op matig.</p>																
<p>Welke soorten en aantallen dieren zullen naar verwachting worden gebruikt? Wat zijn de verwachte ernstgraden en de aantallen dieren in elke ernstcategorie (per soort)?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th rowspan="2">Totaal aantal</th> <th colspan="4">Geraamde aantallen naar ernstgraad</th> </tr> <tr> <th>Terminaal</th> <th>Licht</th> <th>Matig</th> <th>Ernstig</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Muizen (<i>Mus musculus</i>)</td> <td>782</td> <td>0</td> <td>110</td> <td>665</td> <td>7</td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Totaal aantal	Geraamde aantallen naar ernstgraad				Terminaal	Licht	Matig	Ernstig	Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	782	0	110	665	7
Soort:	Totaal aantal			Geraamde aantallen naar ernstgraad													
		Terminaal	Licht	Matig	Ernstig												
Muizen ( <i>Mus musculus</i> )	782	0	110	665	7												
<p>Wat gebeurt er met de dieren die aan het einde van de procedure in leven worden gehouden?</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Soort:</th> <th colspan="3">Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren</th> </tr> <tr> <th>Hergebruikt</th> <th>Teruggeplaatst</th> <th>Geadopteerd</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren			Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd									
Soort:	Geraamd aantal te hergebruiken, in het habitat-/houderijsysteem terug te plaatsen of voor adoptie vrij te geven dieren																
	Hergebruikt	Teruggeplaatst	Geadopteerd														
<p>Geef de redenen voor het geplande lot van de dieren na de procedure.</p>	<p>Bij alle dieren zullen we de binnenoren met slakkenhuis verwijderen voor verdere analyses. Bij deze procedure worden de dieren gedood.</p>																

## TOEPASSING VAN DE DRIE V'S

<p><b>1. Vervanging</b> Beschrijf welke diervrije alternatieven op dit gebied voorhanden zijn en waarom zij niet voor het project kunnen worden gebruikt.</p>	<p>Alternatieven bestaan uit zogenaamde organoïden. Organoïden zijn stamcelkweken die van verschillende soorten weefsel en organen afgeleid kunnen worden en die cellen produceren die voor het onderzoek bestudeerd kunnen worden, in dit geval haarcellen. We kunnen echter met organoïden niet onderzoeken hoe de schadelijke geneesmiddelen de haarcellen in het hele gehoororgaan binnendringen, wat het gehoorverlies is ten gevolge van de schadelijke geneesmiddelen, en hoe goed het gehoorverlies kan worden beperkt met eventueel nieuwe stoffen. We hebben daarvoor het hele gehoorsysteem nodig, met slakkenhuis, gehoorzenuw en hersenstam, en dus hebben we de proefdieren nodig.</p>
<p><b>2. Vermindering</b> Leg uit hoe de aantallen dieren voor dit project zijn bepaald. Beschrijf de stappen die zijn genomen om het aantal te gebruiken dieren te verminderen en de beginselen die zijn gebruikt bij het opzetten van de studies. Beschrijf, waar van toepassing, de praktijken die gedurende het hele project zullen worden toegepast om het aantal dieren die in overeenstemming met de wetenschappelijke doelstellingen werden gebruikt, tot een minimum te beperken. Deze praktijken kunnen bijvoorbeeld bestaan uit proefprojecten, computermodellen, het delen van weefsel en hergebruik.</p>	<p>Het geschatte aantal dieren is bepaald met behulp van een soort berekeningen die ontwikkeld zijn om een benodigd aantal te bepalen. Hierbij is een balans gezocht tussen wat nodig is voor wetenschappelijke waarde en het laag houden van het aantal. We maken gebruik van data van muizen uit eerdere studies en we doen vervolggexperimenten slechts dan wanneer de uitkomsten van de eerdere experimenten gunstig zijn.</p>
<p><b>3. Verfijning</b> Geef voorbeelden van de specifieke maatregelen (bv. verscherpte monitoring, postoperatieve behandeling, pijnbestrijding, training van dieren) die in verband met de procedures moeten worden genomen om de welzijnskosten (schade) voor de dieren tot een minimum te beperken. Beschrijf de mechanismen om gedurende de looptijd van het project nieuwe verfijningstechnieken in gebruik te nemen.</p>	<p>We hebben veel ervaring met de procedures die we in het voorgestelde onderzoek beschrijven: a) metingen met ABRs, b) toediening van kanamycine en furosemide bij muizen, en c) operaties om plaatselijk stoffen toe te dienen.</p> <p>De dieren zullen goed geobserveerd worden zoals boven beschreven, en we hebben een uitstekend team dierverzorgers beschikbaar om hierbij te helpen, wat het dierenwelzijn ten goede komt. De dieren krijgen pijnmedicatie waar nodig.</p> <p>In geval van ernstige bijwerkingen, infecties, en/of gewichtsverlies ten gevolge van injecties en behandelingen, zullen de dieren gedood worden om verder lijden te voorkomen.</p>
<p>Licht de keuze van de soorten en de bijbehorende levensstadia toe</p>	<p>We gebruiken muizen om de volgende redenen.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1) Bij muizen kunnen we gehoorverlies aanbrengen zoals dat veel voorkomt bij mensen, namelijk veroorzaakt door medicatie met ernstige bijwerkingen.</li><li>2) We hebben ruime ervaring met gehooronderzoek bij muizen.</li></ol> <p>In principe zijn alle levensstadia relevant aangezien behandeling met antibiotica en chemo in alle fases kan voorkomen. We richten ons in het huidige project op jongvolwassen muizen om effecten van leeftijd te voorkomen en vergelijkingen tussen groepen zo goed mogelijk te kunnen doen. In toekomstige projecten zou naar het effect van leeftijd gekeken kunnen worden.</p>

**VOOR EEN BEOORDELING ACHTERAF GESELECTEERD PROJECT**

Project geselecteerd voor BA?	ja
Termijn voor BA	30-09-2030
<a href="#">Reden voor de beoordeling achteraf</a>	
Bevat ernstige procedures	ja
Maakt gebruik van niet-menselijke primaten	
Andere reden	
Toelichting van de andere reden voor de beoordeling achteraf	

**AANVULLENDE VELDEN**

Link naar de eerdere versie van de NTS buiten het EC-systeem	
--	--

Current version: 7.6.202408221149 (b31eff9)Version date: 2024-08-22 11:50:01

[Top](#) | [Contact](#) | [Cookies](#) | [Privacy\\_policy](#) | [Legal notices](#)



## 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 neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 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	Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 1.3					
		<input type="checkbox"/> Wijziging > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.1					
		<input type="checkbox"/> Melding > Vul hiernaast het AVD nummer van uw vergunde project in en ga verder met vraag 2.2					
1.3	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie		UMC Utrecht			
		Titel, voorletters en achternaam van de portefeuillehouder		Titel	Voorletters	Achternaam	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres contactpersoon		info@ivd-utrecht.nl			
		Titel, voorletters en achternaam van de diens gemachtigde (indien van toepassing)		Titel	Voorletters	Achternaam	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw
		E-mailadres gemachtigde					
	Vul de gegevens van het postadres in.	Straat en huisnummer		Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht			50
		Postcode en plaats		3584CJ	UTRECHT		
		Postbus, postcode en plaats		80125	3508TC	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		Wetenschappelijk onderzoeker			
		Afdeling		Keel-, Neus- en Oorheelkunde			
		Telefoonnummer					

1.5	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Wetenschappelijk onderzoeker
		Afdeling	Keel-, Neus- en Oorheelkunde
		Telefoonnummer	[REDACTED]
1.6	<i>(Indien van toepassing)</i> Vul hier de gegevens in van de persoon aan wie de portefeuillehouder de verantwoordelijkheid inzake de algemene uitvoering van het project en de overeenstemming daarvan met de projectvergunning heeft gedelegeerd.	E-mailadres	[REDACTED]
		(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	KNO-arts
		Afdeling	Keel-, Neus- en Oorheelkunde
		Telefoonnummer	[REDACTED]
1.7	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de Instantie voor Dierenwelzijn	E-mailadres	[REDACTED]
		Telefoonnummer	030-2531569
1.8	Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
		<input checked="" type="checkbox"/> Nee	

## 2 Over uw aanvraag

2.1	Gaat uw aanvraag over een <i>wijziging</i> op een vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder kort de wijziging en de onderbouwing daarvan weer. Geef in de originele formulieren (niet-technische samenvatting, projectvoorstel en bijlage dierproeven) duidelijk aan (bij voorbeeld in een andere kleur) waar de projectaanvraag wijzigt. Ga daarna verder met vraag 6.
2.2	Gaat uw aanvraag over een <i>melding</i> op een vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn?	<input type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
		<input type="checkbox"/> Ja > Geef hier onder weer wat deze melding inhoudt en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

3.1	Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 10 - 2024
		Einddatum (t/m)	30 - 9 - 2029
3.2	Wat is de titel van het project?	Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss	
3.3	Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Bescherming van het gehoor en behandeling van gehoorverlies	
3.4	Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) van voorkeur?	Naam DEC	DEC Utrecht
		Postadres	Postbus 85500 3508 GA Utrecht
		E-mailadres	dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Factuurgegevens

- 4.1 (indien factuuradres afwijkt van de gegevens uit vraag 1.3) Vul de gegevens van het factuuradres in.

Naam: UU-ASC	Afdeling:	Huisnummer:
Straat:		
Postcode:	Plaats:	
Postbus: 80.011	Postcode: 3508TA	Plaats: UTRECHT
E-mail: asc.factuur@uu.nl		

- 4.2 (optioneel) Vul hier het ordernummer van de instelling in.

Ordernummer: CB.841910.3.01.011
------------------------------------

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht
<input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel      Aantal bijlage(n) dierproeven 1
<input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting
Overige bijlagen, indien van toepassing
<input type="checkbox"/> Melding Machtiging
<input type="checkbox"/>

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD en per post naar de Centrale Commissie Dierproeven (voor adresgegevens zie website)

Ondertekening door de portefeuillehouder namens de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.8). 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 C 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	Utrecht
Datum	
Handtekening	



## Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal for animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht
1.3 Provide the title of the project.	Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss

### 2 Categories

2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic research
	<input type="checkbox"/> Translational or applied research
	<input type="checkbox"/> Regulatory use or routine production
	<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal
	<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures
	<input type="checkbox"/> Higher education or training
	<input type="checkbox"/> Forensic enquiries
	<input type="checkbox"/> Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.1.

#### **Sensorineural hearing loss**

Sensorineural hearing loss is a growing problem. About 16% of the adult population has a disabling hearing loss and its prevalence dramatically increases due to increasing life expectancy (Cunningham & Tucci, 2017).

Hearing impairment is now the third leading cause of years lived with a disability (World Report on Hearing, WHO). Hearing loss is caused by among other factors aging, noise trauma and ototoxicity. The latter is not only a problem in adults but also in children including those who are treated for cancer with cisplatin. Up to 60% of those children suffer hearing loss induced by cisplatin (Meijer et al., 2022), a percentage also reported for adults (Tan & Vlajkovic, 2023). In our lab we have used ototoxically induced hearing loss in the experimental animals (guinea pigs, mice) as a model of hearing loss (AVD11500201550, AVD1150020174315, AVD1150020186105). We showed changes in electrical responsiveness of the auditory nerve in guinea pigs related to its gradual degeneration (Ramekers et al., 2020, 2022) and comparing various neurotrophic compounds regarding prevention of neural degeneration we found a combination of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT-3) to be optimal (Vink et al., 2020, 2021, 2022, 2023), findings relevant for cochlear implantation in patients with severe hearing loss. We found survival of supporting cells with regenerative capacity in deafened mice, which is relevant for future regenerative therapies (Smith-Cortinez et al., 2021, 2023). Ototoxicity is an adverse pharmaceutical response that causes cochlear or vestibular dysfunction. Clinically, aminoglycoside antibiotics (e.g., kanamycin, gentamicin), loop diuretics, macrolide antibiotics, antimalarials, and platinum-based chemotherapeutic cancer medicines (e.g., cisplatin, carboplatin) are the most often used ototoxic medications (Rybak and Ramkumar, 2007). Aminoglycoside antibiotics and cisplatin and its derivatives are two of them that have a high potential for ototoxicity and are utilized in a variety of treatments (Gibaja et al., 2022). In this project, we will focus on aminoglycoside antibiotics (particularly on kanamycin) and cisplatin. Kanamycin is an ototoxic drug that we have used to create a model of severe hearing loss in above-mentioned projects (AVD11500201550, AVD1150020174315, AVD1150020186105). Kanamycin is used to treat drug-resistant tuberculosis in particular in developing nations due to its cost effective nature (Sagwa et al., 2015; Dillard et al., 2021). Cisplatin ototoxicity has been studied in the past in our lab and it has gained new interest because of the collaboration of our department with the national center for child cancer care in Utrecht, the Princess Máxima Center (PMC). Considering the high percentage of children suffering hearing loss for the rest of their life, it has great societal relevance to prevent and/or treat this loss. The similarities and differences in the mechanism of action of these two ototoxic drugs can provide useful insights into future development in therapeutics against drug induced ototoxicity.

### **Bioactive lipids**

Bioactive lipids are a family of endogenous derivatives of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and phospholipids, which exert a number of physiological functions in the human body. Yet, they participate in a complex network of molecular/cellular events, which are involved in a variety of physiological and pathological conditions such as inflammation, neurodegenerative disorders, diabetes, autoimmune diseases, and fibrosis (Leuti et al., 2020). Several bioactive lipids have been found thus far; in this project, we focus on two major classes: endocannabinoids (eCBs) and specialized-pro-resolving lipid mediators (SPMs). Both eCBs and SPMs are important immunomodulatory molecules with important implications for the human health. In the following paragraphs, we describe the metabolism and signaling of eCB and SPMs, as well as their role in the cochlea under physiological and pathological conditions (with a focus on ototoxicity).

eCBs are a family of bioactive lipids that interact with the cannabinoid receptors and mediate actions comparable to 9-tetrahydrocannabinol (THC), the major psychoactive component of *Cannabis sativa* and *Cannabis indica* plants. They regulate cognition and a variety of other physiological processes in both neuronal and non-neural tissues (Maccarrone et al., 2023). The eCBs, their biosynthetic and degradative enzymes, receptors, and membrane transporters compose the "endocannabinoid system" (ECS). The most known and characterized eCBs are N-arachidonylethanolamine (AEA) (that is an amide of AA with ethanolamine) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (that is an ester of AA with glycerol). According to recent research, these lipids are emerging as "immunomodulatory mediators". Indeed, it is well established that changes in eCB levels, as well as in other components of the ECS, occur in several chronic inflammatory-related disorders, such as rheumatoid arthritis, cancer, cardiovascular and neuroinflammatory diseases (Leuti et al., 2020).

SPMs are a wide class of bioactive lipids generated from omega-3 PUFAs and, to a lesser degree, from arachidonic acid (AA). SPMs play a pivotal role as "orchestrators" of resolution of inflammation. This is a relatively new concept concerning the inflammatory responses, whose termination was considered to be a passive process for a long time, mainly due to the gradual dissipation of pro-inflammatory mediators. Today,

it is known that this is instead an active process, known as “resolution of inflammation”, that is mediated by the SPMs. It is increasingly evident that the pathophysiology of most chronic inflammatory diseases may be linked to a dysregulation of SPMs (Leuti et al., 2020).

### Bioactive lipids in the cochlear physiology and pathology

The role of ECS in the auditory system has been poorly investigated compared to the number of studies available for other tissues. To date, it is known that the ECS is distributed throughout the auditory circuit, influencing various glycinergic, glutaminergic, and cholinergic signals which regulate auditory function (Ghosh et al., 2021) (Figure 1).

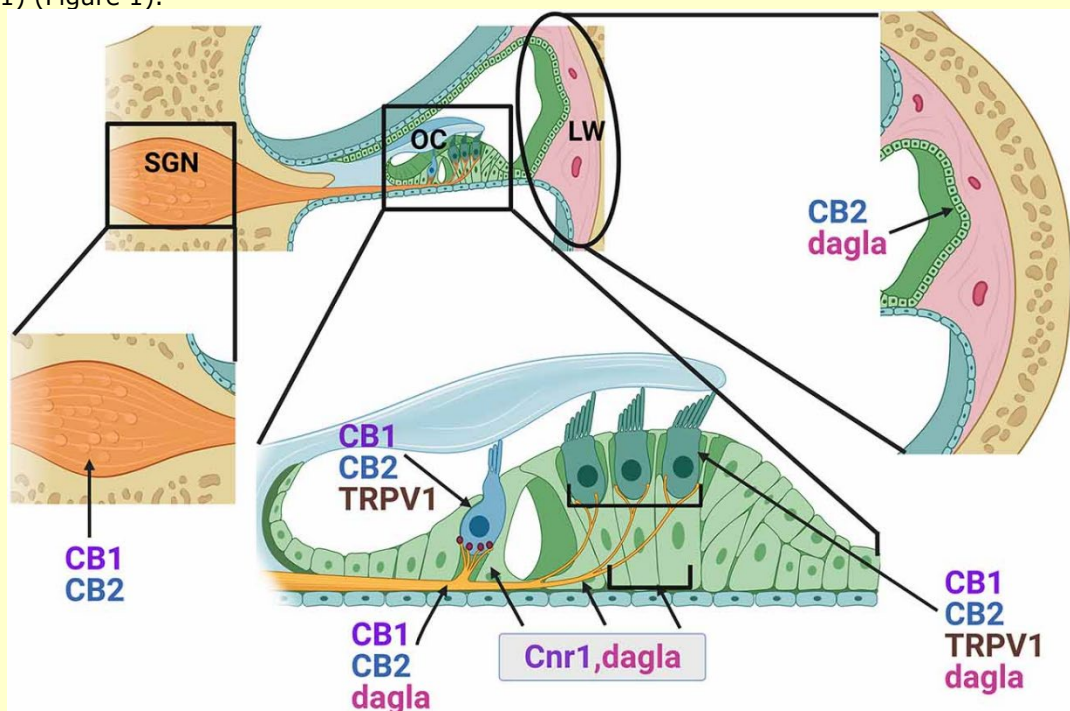


Figure 1. Schematic representation of ECS distribution in the cochlea (Ghosh et al., 2021)

1. Most of the functional data on the role of the ECS in the cochlea concerns the eCB receptors. Studies employing knock-out mice indicated that CB1 is involved in auditory detection and processing (Toal et al., 2016). Also, activation of CB2 is required for normal cochlear function. Indeed, antagonism of CB2 by its genetic ablation in mice led to synaptopathy, probably due to the loss of ribbon synapses (Ghosh et al., 2018). In addition, TRPV1, 3, and 4 deletion causes hearing abnormalities in mice (Wang et al., 2019), indicating that those receptors, and hence eCB signaling, play important roles in proper hearing function. Furthermore, ototoxic aminoglycosides (as kanamycin) can affect the expression of all four TRPV channels (Kitahara et al., 2005). Overall, the available literature indicates a fundamental role of ECS in regulating cochlear development and function. However, data are still limited to few studies and this calls for the need of additional investigations in the field to further explore the possible implications of the eCB signaling in auditory function. As for the role of SPMs in cochlear physiology and pathology, even less studies are available. Of our knowledge, to date only one study was focused on the investigation of SPMs function in the cochlea. (Kalenic et al., 2009) localized the ALX/FPR2 receptor in inner and outer hair cells and in some population of supporting cells, namely Deiters' and pillar cells. It is known from the literature that SPMs have a role in the cochlear physiology and pathology (drug, age and noise induced hearing loss) (Kalinec et al., 2017), and apart from that a solid evidence on their role in resolution of inflammation (one of the major players in drug-induced ototoxicity) and lastly the upcoming works on the cross-talk between eCBs and SPMs (Leuti et al., 2024). In addition, the lab that we collaborate in Italy with has extensive experience on SPMs. This prompts us to investigate SPMs in our models.

After ototoxic medications, it has been demonstrated that immune system cells infiltrate the cochlea; nevertheless, the immune system's role in the loss of hair cells in the inner ear and further cochleotoxicity remains unclear. Ototoxic drug administration frequently causes inflammation, which exacerbates the drugs' absorption and utilization by the cochlea. eCBs and SPMs play an important role in inflammation and resolution of inflammation. Several studies have demonstrated the role of eCB system in cisplatin induced systemic toxicity (Ghosh et al., 2018). For instance, a study demonstrated that a selective agonist of the CB<sub>2</sub>R, 2-methyl-1-propyl-1H-indol-3-yl)-1-naphthalenylmethanone (JWH015), when administered trans-tympanically in male wistar rats prevents cisplatin-induced hearing loss. This effect was reversed when 6-iodo-2-methyl-1-[2-(4-morpholinyl)ethyl]-1H-indol-3-yl](4-methoxyphenyl)methanone (AM630), an antagonist of the CB<sub>2</sub>R, was used to block the receptor (Ghosh et al., 2018). Similarly in another study usage of TRPV1 agonist orally or trans-tympanically, prevented cisplatin induced ototoxicity in rats (Bhatta et al., 2019). SPMs with crucial roles are produced during inflammatory processes (Kalinec et al., 2017). To our knowledge, only one study has investigated the role of SPMs in cisplatin induced ototoxicity. Notably, the pro-resolution mediator Annexin 1 (ANXA1) (binds to ALX/FPR2) was one of the proteins whose expression pattern was found to change, and it was discovered that cisplatin exposure significantly increased its expression (Zhang et al., 2012). Furthermore, ANXA1 knockdown was demonstrated to dramatically increase DNA damage caused by cisplatin. Knowledge on the role of eCBs in aminoglycoside ototoxicity is very limited (Stepanyan et al., 2011).

eCBs are known to play both pro- and anti-inflammatory roles depending on the context and SPMs instead are major players in resolving inflammatory processes. It is noteworthy to mention that eCBs have been extensively studied in the context of inflammation, but they are also involved in a number of pathophysiological processes, including pathways leading to cell death and oxidative stress. Hence, our goal here is to understand if these classes of bioactive lipids (eCBs and SPMs) play a role in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity and if yes, do they mediate otoprotection and what are the molecular underpinnings?

To answer these questions we first set up an *in vitro* model of ototoxicity which is described in the following paragraphs.

*In vitro* work:

As a first step, we had set up an *in vitro* model of cisplatin induced ototoxicity in UB/OC1 hair cell precursors. We also evaluated the cell line by demonstrating the expression of Myosin 7a (a characteristic hair cell marker of the cochlea). To set up the ototoxic model, we treated with different concentrations of cisplatin ranging from 2.5 to 50  $\mu$ M and evaluated the cell viability by MTT assay. We then chose the IC<sub>50</sub> (30 $\mu$ M) of cisplatin to proceed with to characterize the entire primary eCB signaling components; receptors (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, GPR55, TRPV1, PPAR $\alpha$ / $\gamma$ / $\delta$ ) and enzymes (NAPE-PLD, DAGL $\alpha$ / $\beta$ , FAAH, MAGL). We found the expression of the following components in the cell line (Receptors: CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, TRPV1 and PPAR  $\delta$ ) and enzymes (DAGL $\alpha$ / $\beta$ , FAAH). Upon cisplatin induced ototoxicity we found that the receptor CB<sub>2</sub> and the enzyme DAGL $\beta$  were significantly downregulated by ~22% and ~40% respectively. The other components did not show any changes upon the treatment. The data are shown below:

**DISCLAIMER: THE RESULTS SHOWN BELOW ARE UNPUBLISHED, CONFIDENTIAL, AND NOT TO BE DISCLOSED**

**Establishment of an *in vitro* ototoxic model:**

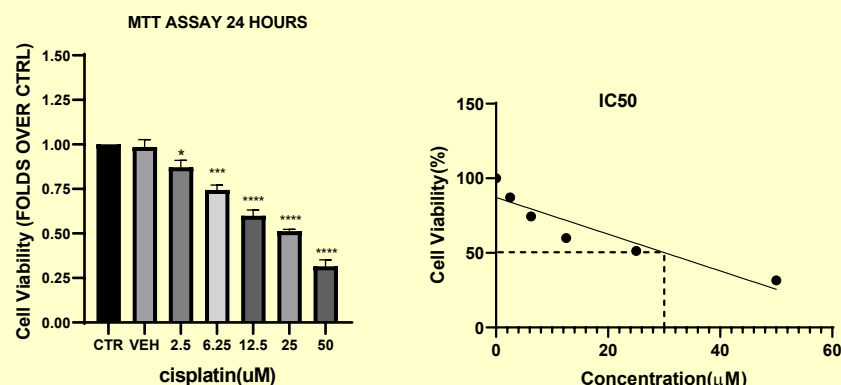


Figure 2: Dose- response study for cisplatin in UB/OC1 hair cells

### Down regulation of CB<sub>2</sub>R and DAGL $\beta$ upon cisplatin induced ototoxicity:

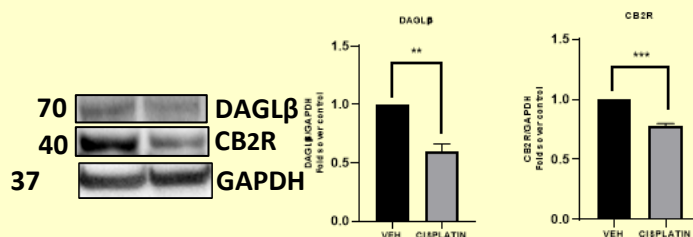


Figure 3: Representative western blots and the quantifications of the receptor CB<sub>2</sub> and DAGL  $\beta$  upon cisplatin induced ototoxicity

It is evident that bioactive lipids such as eCBs and SPMs play a role in drug induced ototoxic processes. Hence, understanding the molecular underpinnings in drug induced ototoxicity in relation to bioactive lipids can provide insights into unknown molecular mechanisms and promising therapeutic interventions.

### 3.2 Purpose

3.2.1 Describe the project's immediate and ultimate goals. Describe to which extent achieving the project's immediate goal will contribute to achieving the ultimate goal.

- If applicable, describe all subobjectives

Ultimate goal: protect hearing against ototoxicity and treat sensorineural hearing loss by targeting specific molecules and pathways that play a major role in sensory cell damage.

Immediate goals: (i) To investigate which class of bioactive lipids (eCB/SPM/both) are involved in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.

(ii) To investigate which components(receptors/enzymes/both) of the eCB/SPM are involved in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.

(iii) To characterize the effect size of the observed modulation (if any) of the components of the eCB/SPM after ototoxicity.

(iv) To characterize the direction of the modulation (if any), i.e., upregulation or downregulation of the components of the eCB/SPM system after ototoxicity.

- (v) To investigate the similarities/differences in the response to bioactive lipid components after cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.
- (vi) To investigate the possible putative otoprotection mediated by the selected agonist/antagonist/siRNA against cisplatin and kanamycin induced hearing loss
- (vii) To investigate the mechanisms (similar/ different) underpinning the bioactive lipid response after cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.

We reach then the general fundamental goals: 1) Understand molecular mechanisms that contribute to damage and loss of cochlear cells after treatment with ototoxic drugs. 2) Understand the role of bioactive lipids in ototoxicity. 3) Use understanding of the molecular mechanisms underlying ototoxicity including the role of bioactive lipids (eCBs, SPMs) to find appropriate therapeutic drugs to protect the cochlea against ototoxic insults.

To reach the immediate goals we will examine the extent of modulation of the various eCBs and SPMs by the ototoxic insults by kanamycin and cisplatin. We like to find the specific eCBs and SPMs that are modulated the most, and we will examine whether using these eCBs and/or SPMs as therapeutic drug will prevent hearing loss. When drug candidates have been found we can test these in translational studies towards the ultimate goal.

Research questions:

1. Are eCBs and SPMs involved in cisplatin and kanamycin- induced ototoxicity?
- 2a. Will administration of agonists/antagonists/siRNA's of eCBs and SPMs provide potential protective effects against ototoxicity?
- 2b. What are the possible molecular mechanisms (general and specific) of otoprotection after administration of agonists/antagonists/siRNAs against cisplatin and kanamycin induced ototoxicity?

### 3.2.2 Provide a justification for the project's feasibility.

After numerous studies with guinea pigs, and wild type and Lgr5-GFP transgenic mice in our recent CCD licenses (AVD11500201550, AVD1150020174315 and AVD1150020186105), our research group has ample experience with the surgical procedures, electrophysiological measurements, histological and molecular. The funding for the animal experiments has been arranged via the Heinsius Houbolt Foundation (a yearly grant we receive). With the combined expertise of the group (research lab and clinical otology), which includes expertise in electrophysiology and hearing and cellular and molecular expertise this project is set to succeed. We have an international collaboration [redacted] with specific expertise in bioactive lipids that will strengthen this project. The group in Italy [redacted] has extensive experience working with bioactive lipids (eCBs and SPMs) in the context of inflammation (Navarini et al., 2022; Greco et al., 2020; Leuti et al., 2020), neurodegeneration (Chiurchiù et al., 2021) and retinopathies (Tisi et al., 2023) in both *in vitro* and *in vivo* models. This growing body of evidence on the role of bioactive lipids in various cellular and molecular processes prompts us to move towards characterizing their signaling processes in neurosensory degeneration of the cochlea (drug-induced hearing loss). We have a collaboration with the PMC, which will strengthen efforts in translational studies when the project yields promising therapeutics.

### 3.2.3 Are, for conducting this project, other laws and regulations applicable that may affect the welfare of the animals and/or the feasibility of the project?

No

Yes > Describe which laws and regulations apply en describe the effects on the welfare of the animals and the feasibility of the project.

Click or tap here to enter text.

## 3.3 Relevance

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

The mechanisms underlying damage and loss of sensory cells in the cochlea after insults of ototoxic drugs are not well known. Looking into those mechanisms is therefore scientifically relevant. Note that we have not

specifically addressed mechanisms in previous projects (AVD11500201550, AVD1150020174315 and AVD1150020186105) or in the current project (AVD1500202417856). The role of bioactive lipids has hardly been studied and might give a new approach for research into ototoxic mechanisms.

~~More than 5% of the world's population and 16% of the adult population suffers from disabling hearing loss. The hearing loss can be caused by ototoxic medication including antibiotics like kanamycin and chemotherapeutics like cisplatin.~~

Chemotherapy with cisplatin to treat cancer leads to hearing loss in about 60% of the patients (Tan & Vljakovic, 2023; Meijer et al., 2022; Sanchez et al., 2024), a percentage also observed in children treated for cancer in the PMC in Utrecht. In 18% of the patients the hearing loss is severe to profound, which then requires expensive care with a cochlear implant to (partially) restore hearing. It is estimated that annually worldwide 500.000 patients suffer hearing loss after cisplatin treatment (Sanchez et al., 2024). Kanamycin along with other aminoglycosides is an antibioticum that is used to treat drug-resistant tuberculosis. The treatment causes hearing loss in about 50% of the patients. An estimated 50.000 patients worldwide annually acquire hearing loss after aminoglycoside treatment (Dillard et al., 2021). ~~The latter drug is known to cause hearing loss in about half of the children treated for cancer in the PMC in Utrecht.~~ Prevention and/or treatment would be very important for the quality of life of ~~these children and of many others~~ patients with ototoxically induced hearing loss. In this project we aim to find therapeutical drugs based on the mechanisms among others involving bioactive lipids.

3.3.2 Who are the project's stakeholders? Describe their specific interests.

1. Researchers in the field of inner ear biology and sensorineural hearing loss, because any advancements in the field will also promote their own research.
2. Patients suffering from hearing loss. Our studies could allow us to be one step closer of a therapy for them.
3. Laboratory animals have an interest in not being used as laboratory animals for research. We will make efforts to use as few animals as possible. It is for the laboratory animals important that the experiments are carried out in a responsible and optimal manner, that refinements are properly implemented and that humane endpoints are closely monitored.
4. Otorhinolaryngologists and audiologists who are looking for a better therapeutic approach to treat their patients.
5. Oncologists who prefer to use ototoxic chemotherapy to treat their patients.
6. Grant organizations such as Heinsius Houbolt foundation are important stakeholders because they have financed our research. Heinsius Houbolt is an organization that funds hearing loss-related research.

### 3.4 Strategy

3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy). If applicable, describe the different phases in the project, the coherence, the milestones, selection points and decision criteria.

**The aim of our study is to understand the role of bioactive lipids (eCBs and SPMs) in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.**

***Our primary research questions include the following:***

1. Are eCBs and SPMs involved in cisplatin and kanamycin- induced ototoxicity?
  - 2a. Will administration of agonists/antagonists/siRNA's of eCBs and SPMs provide potential protective effects against ototoxicity?
  - 2b. What are the possible molecular mechanisms (general and specific) of otoprotection after administration of agonists/antagonists/siRNAs against cisplatin and kanamycin induced ototoxicity?

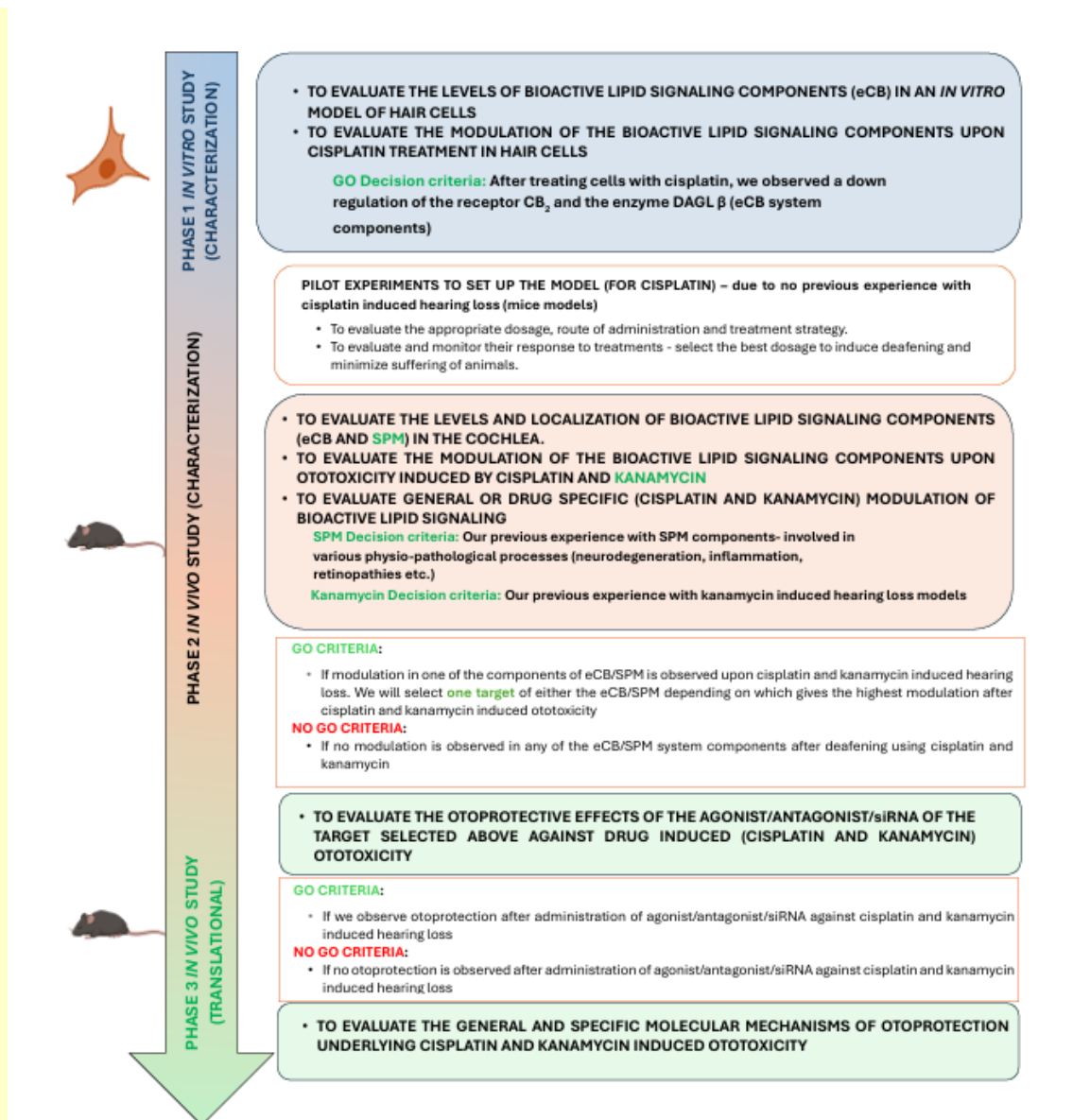


Figure 4: Flowchart of the strategy

The figure above represents an outlook on our strategy. The **green** colour represents the GO decision criteria and the **Red** represents the NO GO decision criteria.

**To answer the above research questions:**

We had primarily set up an *in vitro* model of cisplatin induced ototoxicity and investigated the primary components (receptors and metabolic enzymes) of the eCB system and we found that cisplatin treatment downregulates the receptors CB<sub>2</sub> and the enzyme DAGLβ (see Background 3.1). These promising preliminary results prompt us to move towards investigating the same in *in vivo* models of deafness.

## **In vivo experiments**

From the above-mentioned *in vitro* studies on the involvement of eCBs in cisplatin induced ototoxicity, our experience with kanamycin *in vivo* mouse models (CCD AVD1150020186105), and mounting evidence on the role of eCBs and SPMs in various physiological and pathological processes including their role in drug induced ototoxicity (See section 3.1 Background), we will move towards evaluating the same in *in vivo* models of drug induced ototoxicity.

1. We will use the mouse as animal model. The use of mouse models is essential for studying the effects of pharmacological compounds (receptor inhibitors and agonists) on the progression of hearing loss and on the ability to resolve inflammation. As a preliminary study to evaluate the alterations of eCBs in cisplatin induced hearing loss, we have performed a basic characterization of the modulation and signaling of the eCB system in response to cisplatin induced hearing loss (shown above). Although *in vitro* models serve as a tool to perform basic research, they do not fully recapitulate the complexity of the cochlea. In our *in vitro* study, we have used a hair cell precursor model to answer some of our research questions. But this model lacks the other important population of cell structures present in the cochlea such as supporting cells, stria vascularis, blood-labyrinth barrier, neural system among others which are critical to understand the complex molecular mechanisms underlying cisplatin induced ototoxicity. In addition, currently there are no human cell lines or organoids/3D culture systems that include these complex cell types. It is also important to mention that studying cisplatin/kanamycin in *in vitro* models cannot give a complete overview of the mechanisms behind toxicity since these ototoxic compounds also acts systemically, hence from a translational point of view, studying in animal models can recapitulate the systemic toxicity like that of humans which could provide novel insights into the mechanisms of ototoxicity. Hence, to have a complete picture of cisplatin induced ototoxicity and the role of bioactive lipids in relation to them, and to evaluate possible therapeutic targets from a clinical perspective it necessitates for use of an animal model of hearing loss.
2. We use two different models of ototoxicity: a) kanamycin induced hearing loss and b) cisplatin induced hearing loss. In both models the administration of the ototoxic drug is combined with the administration of furosemide, which significantly enhances the ototoxic effect, which avoids the need to administer the drug more than once (kanamycin) or maximally three times (cisplatin). We have great experience with kanamycin/furosemide treatment which provides as several advantages as being able to compare to our previous studies. We choose cisplatin as second drug for following reasons: 1. Cisplatin is one of the most used chemotherapeutics for a wide range of solid malignant tumors in both adults and children; and as of now at the market, there is only one available drug, sodium thiosulfate, to counteract the adverse effect of cisplatin induced ototoxicity (Brock et al., 2018; Meijer et al., 2024). Sodium thiosulfate is not protective in all cisplatin treated patients with 33% still suffering hearing loss, and therefore, alternatives would be very welcome. Hence cancer patients undergoing cisplatin therapy will have a severe adverse ototoxic effect which could affect their social and emotional well-being. To move towards a translational perspective, understanding the mechanisms of action of cisplatin in the cochlea could be highly beneficial for the birth of future potential therapeutics against cisplatin induced hearing loss. 2. We know from literature that cisplatin can cause ototoxicity in mice as well (Generotti et al., 2022) and the involvement of bioactive lipids in cisplatin ototoxicity (See section 3.1 Background). 3. The two ototoxic drugs, cisplatin and kanamycin, act differently in causing cochlear damage (Kros & Steyger, 2019). The similarities and differences in the roles of eCBs and SPMs will contribute to understanding the molecular mechanisms underlying the cochlear damage. 4. Our connection in Utrecht with PMC. Overall, we aim to achieve a better understanding of the mechanisms of ototoxicity (general and specific for both ototoxic drugs).

To answer our research questions, we will segment our experiments into the following:

### **(i) Pilot Experiment**

We will first set up a pilot experiment for cisplatin ototoxic model to evaluate the dosage, the route of administration, the days of the treatment and possible effects of sex differences. We will then select an appropriate treatment regimen to proceed with Experiment 1.

Note: It is not a go-no go, because both the IP method used on 2 or 3 consecutive days and the IV method on a single day have been shown to work (Li et al., 2011; Ruhl et al., 2019). We like to refine the method by comparing the IV method (as used in the kanamycin procedure) to the IP method in order to reduce number of days needed thereby minimizing the suffering of animals.

- (ii) **Experiment 1** will be performed to evaluate and characterize the eCB and SPM system components in normal-hearing animals and animals with ototoxically induced hearing loss (by cisplatin and kanamycin).

**GO/NO GO criteria:**

**GO:** After complete characterization of the eCB and SPM system (using western blotting, qPCR /RNA-Seq, immunofluorescence and Mass spectrometry) in cisplatin and kanamycin induced hearing loss, we will move to experiment 2 only if we observe significant modulation in any of the components (up-regulation or down-regulation) of the eCB and SPM system in the cisplatin and kanamycin induced hearing loss. We will proceed with Experiment 2 with an agonist if we observe down-regulation and with an antagonist/siRNA if we observe an up-regulation after deafening. We will apply a criterion of >20% difference in protein expression levels of bioactive lipids.

**NO GO:** We will not move to experiment 2 if we do not observe any modulation in eCB and SPM system components after cisplatin and kanamycin induced hearing loss.

- (iii) **Experiment 2a** will be performed to understand the otoprotective effects of agonist/antagonist/siRNA on cisplatin and kanamycin deafened animals. Experiment 2a will be based on the outcomes of experiment 1. We will select an agonist/antagonist/siRNA of the modulated component of either the eCB or the SPM system (based on which signaling component gives a maximal effect upon induction of ototoxicity) to treat the animals to understand the putative otoprotective effects on drug induced hearing loss. We will use three different dosages of the agonist/antagonist/siRNA and 2 different routes of administration (intra-tympanic/intra-cochlear) to select the best dosage and the route of administration to proceed with Experiment 2b.

**GO/NO GO Criteria:**

We will proceed with Experiment 2b based on the outcomes of experiment 2a.

**GO:** We will proceed with Experiment 2b only if we observe otoprotection after administration of agonist/antagonist/siRNA on cisplatin and kanamycin induced hearing loss. An improvement in hearing thresholds determined by ABR recordings of at least 10 dB will be applied as criterion.

**NO GO:** We will not proceed with Experiment 2b if we do not observe any otoprotection after administration of agonist/antagonist/siRNA on cisplatin and kanamycin induced hearing loss.

- (iv) **Experiment 2b** will be performed to investigate the underlying molecular mechanisms (general/specific) of the agonist/antagonist/siRNA on cisplatin and kanamycin induced hearing loss. We will select one dosage and the route of administration based on experiment 2a to perform experiment 2b.

**References**

- Bhatta P, Dhukhwa A, Sheehan K, et al. (2019) Capsaicin Protects Against Cisplatin Ototoxicity by Changing the STAT3/STAT1 Ratio and Activating Cannabinoid (CB2) Receptors in the cochlea. *Sci Rep.* 9:4131. doi:10.1038/s41598-019-40425-9
- Brock PR, Maibach R, Childs M, et al. (2018) Sodium thiosulfate for protection from cisplatin-induced hearing loss. *N Engl J Med.* 378: 2376-2385. doi: 10.1056/NEJMoa1801109
- Cunningham LL, Tucci DL (2017) Hearing Loss in Adults. *N Engl J Med* 377:2465-2473. doi: 10.1056/NEJMra1616601.

Dillard LK, Martinez RX, Perez LL, Fullerton AM, Chadha S, McMahon CM (2021) Prevalence of aminoglycoside-induced hearing loss in drug-resistant tuberculosis patients: A systematic review. *J Infect.* 83:27-36. doi: 10.1016/j.jinf.2021.05.010.

Generotti C, Cox BC, Singh J, et al. (2022) Subclinical diagnosis of cisplatin-induced ototoxicity with biomarkers. *Sci Rep.* 12:18032. doi:10.1038/s41598-022-23034-x

Ghosh S, Sheth S, Sheehan K, Mukherjea D, Dhukhwa A, Borse V, Rybak LP, Ramkumar V (2018) The Endocannabinoid/Cannabinoid Receptor 2 System Protects Against Cisplatin-Induced Hearing Loss. *Front Cell Neurosci.* 12:271. doi: 10.3389/fncel.2018.00271

Ghosh S, Stansak K, Walters BJ (2021) Cannabinoid Signaling in Auditory Function and Development. *Front Mol Neurosci.* 14:678510. doi: 10.3389/fnmol.2021.678510.

Gibaja A, Alvarado JC, Scheper V, Carles L, Juiz JM (2022) Kanamycin and Cisplatin Ototoxicity: Differences in Patterns of Oxidative Stress, Antioxidant Enzyme Expression and Hair Cell Loss in the Cochlea. *Antioxidants (Basel)* 11:1759. doi:10.3390/antiox11091759

Greco L, Russo V, Rapino C, et al. (2020) Characterization of Endocannabinoid System and Interleukin Profiles in Ovine AEC: Cannabinoid Receptors Type-1 and Type-2 as Key Effectors of Pro-Inflammatory Response. *Cells* 9:1008. doi:10.3390/cells9041008

Kalinec F, Webster P, Maricle A, Guerrero D, Chakravarti DN, Chakravarti B, Gellibolian R, Kalinec G (2009) Glucocorticoid-stimulated, transcription-independent release of annexin A1 by cochlear Hensen cells. *Br J Pharmacol.* 158:1820-1834. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00473.x.

Kalinec GM, Lomberk G, Urrutia RA, Kalinec F (2017) Resolution of Cochlear Inflammation: Novel Target for Preventing or Ameliorating Drug-, Noise- and Age-related Hearing Loss. *Front Cell Neurosci.* 11:192. doi: 10.3389/fncel.2017.00192.

Kitahara T, Li H-S, Balaban CD (2005). Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. *Hear. Res.* 201:132-144. doi: 10.1016/j.heares.2004.09.007

Kros CJ, Steyger PS (2019) Aminoglycoside- and cisplatin-induced ototoxicity: Mechanisms and otoprotective strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 9: a033548. doi: 10.1101/cshperspect.a033548

Leuti A, Fazio D, Fava M, Piccoli A, Oddi S, Maccarrone M (2020) Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Advanced drug delivery reviews* 159: 133-169. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.028>

Leuti A, Fava M, Forte G, et al. (2024) The endocannabinoid anandamide activates pro-resolving pathways in human primary macrophages by engaging both CB<sub>2</sub> and GPR18 receptors. *FASEB J.* 38:e23675. doi:10.1096/fj.202301325R

Li Y, Ding D, Jiang H, Fu Y, Salvi R (2011) Co-administration of cisplatin and furosemide causes rapid and massive loss of cochlear hair cells in mice. *Neurotox Res.* 20:307-319. doi: 10.1007/s12640-011-9244-0

Maccarrone M, Di Marzo V, Gertsch J, Grether U, Howlett AC, Hua T, Makriyannis A, Piomelli D, Ueda N, van der Stelt M (2023) Goods and Bads of the Endocannabinoid System as a Therapeutic Target: Lessons Learned after 30 Years. *Pharmacol Rev.* 75:885-958. doi: 10.1124/pharmrev.122.000600. (Erratum in: *Pharmacol Rev.* 2023; 76:194)

Meijer AJM, Li KH, Brooks B, Clemens E, Ross CJ, Rassekh SR, Hoetink AE, van Grotel M, van den Heuvel-Eibrink MM, Carleton BC (2022) The cumulative incidence of cisplatin-induced hearing loss in young children is higher and develops at an early stage during therapy compared with older children based on 2052 audiological assessments. *Cancer* 128:169-179. doi: 10.1002/cncr.33848.

Meijer AJM, Diepstraten FA, Ansari M, et al. (2024) Use of sodium thiosulfate as an otoprotectant in patients with cancer treated with platinum compounds: A review of the literature. *J Clin Oncol.* 42:2219-2232. doi: 10.1200/JCO.23.02353.

- Navarini L, Vomero M, Di Donato S, et al. (2022) 2-Arachidonoylglycerol Reduces the Production of Interferon-Gamma in T Lymphocytes from Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Biomedicines* 10:1675. doi:10.3390/biomedicines10071675
- Ramekers D, Klis SFL, Versnel H (2020) Simultaneous rather than retrograde spiral ganglion cell degeneration following ototoxically induced hair cell loss in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 390, 107928. doi:10.1016/j.heares.2020.107928
- Ramekers D, Benav H, Klis SFL, Versnel H (2022) Changes in the electrically evoked compound action potential over time after implantation and subsequent deafening in guinea pigs. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 23:721-738. doi:10.1007/s10162-022-00864-0
- Ruhl D, Du TT, Wagner EL, et al. (2019) Necroptosis and Apoptosis Contribute to Cisplatin and Aminoglycoside Ototoxicity. *J Neurosci.* 39:2951-2964. doi:10.1523/JNEUROSCI.1384-18.2019
- Rybak LP, Ramkumar V (2007) Ototoxicity. *Kidney International* 72: 931-935. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002434>.
- Sagwa EL, Ruswa N, Mavhunga F, Rennie T, Leufkens HG, Mantel-Teeuwisse AK (2015). Comparing amikacin and kanamycin-induced hearing loss in multidrug-resistant tuberculosis treatment under programmatic conditions in a Namibian retrospective cohort. *BMC Pharmacol Toxicol.* 16:36. doi:10.1186/s40360-015-0036-7
- Sanchez VA, Dinh PC Jr, Monahan PO, Althouse S, Rooker J, Sesso HD, Dolan ME, Weinzerl M, Feldman DR, Fung C, Einhorn LH, Frisina RD, Travis LB (2024) Comprehensive audiologic analyses after cisplatin-based chemotherapy. *JAMA Oncol.* 10:912-922. doi: 10.1001/jamaoncol.2024.1233
- Smith-Cortinez N, Yadak R, Hendriksen FGJ, Sanders E, Ramekers D, Stokroos RJ, Versnel H, Straatman LV (2021). LGR5-positive supporting cells survive ototoxic trauma in the adult mouse cochlea. *Front Mol Neurosci.* 14:729625. doi: 10.3389/fnmol.2021.729625
- Smith-Cortinez N, Hendriksen FGJ, Ramekers D, Stokroos RJ, Versnel H, Straatman LV (2023). Long-term survival of LGR5 expressing supporting cells after severe ototoxic trauma in the adult mouse cochlea. *Front Cell Neurosci.* 17:1236894. doi: 10.3389/fncel.2023.1236894.
- Stepanyan RS, Indzhykulian AA, Vélez-Ortega AC, et al. (2011) TRPA1-mediated accumulation of aminoglycosides in mouse cochlear outer hair cells. *J Assoc Res Otolaryngol.* 12:729-740. doi:10.1007/s10162-011-0288-x
- Tan WJT, Vlajkovic SM (2023) Molecular characteristics of cisplatin-induced ototoxicity and therapeutic interventions. *Int J Mol Sci.* 24:16545. doi: 10.3390/ijms242216545.
- Tisi A, Carozza G, Leuti A, Maccarone R, Maccarrone M. (2023) Dysregulation of Resolvin E1 Metabolism and Signaling in a Light-Damage Model of Age-Related Macular Degeneration. *Int J Mol Sci.* 24:6749. doi:10.3390/ijms24076749
- Toal KL, Radziwon KE, Holfoth DP, Xu-Friedman MA, Dent ML (2016) Audiograms, gap detection thresholds, and frequency difference limens in cannabinoid receptor 1 knockout mice. *Hear Res.* 332:217-222. doi: 10.1016/j.heares.2015.09.013.
- Vink HA, van Dorp WC, Thomeer HGXM, Versnel H, Ramekers D (2020) BDNF outperforms TrkB agonist 7,8,3'-THF in preserving the auditory nerve in deafened Guinea pigs. *Brain Sci.* 10, 787. doi: 10.3390/brainsci10110787
- Vink HA, Versnel H, Kroon S, Klis SFL, Ramekers, D (2021) BDNF-mediated preservation of spiral ganglion cell peripheral processes and axons in comparison to that of their cell bodies. *Hear. Res.* 400, 108114. doi:10.1016/j.heares.2020.108114
- Vink HA, Ramekers D, Thomeer HGXM, Versnel H (2022) Combined brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 treatment is preferred over either one separately in the preservation of the auditory nerve in deafened guinea pigs. *Front. Mol. Neurosci.* 15:935111. doi: 10.3389/fnmol.2022.935111

Vink HA, Ramekers D, Foster AC, Versnel H (2023) The efficacy of a TrkB monoclonal antibody agonist in preserving the auditory nerve in deafened guinea pigs. *Hear Res.* 439:108895. doi: 10.1016/j.heares.2023.108895

Wang S, Geng Q, Huo L, Ma Y, Gao Y, Zhang W, Zhang H, Lv P, Jia Z (2019) Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily Vanilloid 4 and 3 in the Inner Ear Protect Hearing in Mice. *Front Mol Neurosci.* 12:296. doi: 10.3389/fnmol.2019.00296.

Zhang G, Sun L, Lu X, et al. (2012) Cisplatin treatment leads to changes in nuclear protein and microRNA expression. *Mutat Res.* 746:66-77. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.03.004

### 3.4.2 Provide a justification for the strategy described above.

Our strategy is based on our promising preliminary *in vitro* results and our experience in hearing loss models along with our strong expertise in bioactive lipid signaling. Our experiment 1 is a complete characterization of the eCB and SPM signaling components. Our experiment 2a aims to understand the putative otoprotective effects of the agonist/antagonist/siRNA of the eCB and SPM system components on drug induced ototoxicity. We will move to experiment 2a only if we see any significant modulation of the eCB and SPM components upon ototoxic treatments. We will choose one protective treatment strategy (either an agonist/antagonist/siRNA of eCB or of the SPM) depending on which class of bioactive lipid gives a maximal effect after drug induced ototoxicity. We will use three different dosages of the agonist/antagonist/siRNA and 2 different routes of administration to validate the best course of treatment. We will proceed with experiment 2b based on the outcomes of experiment 2a (i.e.) if we observe any otoprotection after our treatment. Our experiment 2b aims to understand the general/specific molecular mechanisms of otoprotection behind cisplatin and kanamycin induced hearing loss.

### 3.4.3 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	The role of bioactive lipids in sensorineural hearing loss
2	Click or tap here to enter text.
3	Click or tap here to enter text.
4	Click or tap here to enter text.
5	Click or tap here to enter text.
6	Click or tap here to enter text.
7	Click or tap here to enter text.
8	Click or tap here to enter text.
9	Click or tap here to enter text.
10	Click or tap here to enter text.



## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information on the project proposal, see the Guidelines to the project licence application form for animal procedures on our website ([www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

11500

- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.

UMC Utrecht

- 1.3 List the serial number and type of animal procedure

*Use the numbers provided at 3.4.3 of the project proposal.*

Serial number	Type of animal procedure
1	The role of bioactive lipid signaling (endocannabinoids and specialized pro-resolving lipid mediators) in sensorineural hearing loss

### 2 Description of animal procedures

#### A. Experimental approach and primary outcome parameters

Describe the general design of the animal procedures in relation to the primary outcome parameters. Justify the choice of these parameters.

##### Experimental Approach:

The study has been segmented into 2 main experiments (Experiment 1 and 2) for the purpose of understanding the role of bioactive lipids in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.

*Our primary research questions to be addressed in two experiments are:*

1. Are eCBs and SPMs involved in cisplatin- and kanamycin- induced ototoxicity?
- 2a. Will administration of agonists/antagonists/siRNAs of eCBs and SPMs provide potential protective effects against ototoxicity?
- 2b. What are the possible molecular mechanisms (general and specific) of otoprotection after administration of agonists/antagonists/siRNAs against cisplatin and kanamycin induced ototoxicity?

##### *Animal experiment design*

### **Pilot Experiment 1 (For cisplatin induced hearing loss model):**

Before proceeding with the experiment 1, we will set up a pilot study to select the best dosage and the route of administration to set up the cisplatin induced ototoxic model (cisplatin+furosemide). Furthermore, the effect of gender on sensitivity to ototoxic treatment will be examined since we have observed that male mice suffer more hearing loss than female mice when exposed to kanamycin. The pilot will also give the opportunity to determine, in consultation with the animal welfare body Utrecht, humane endpoints after cisplatin/furosemide treatment. We will not conduct a pilot study for kanamycin because we have previous experience with kanamycin induced hearing loss models of mice. We will use 2 different dosages of cisplatin and two different routes of administration for furosemide to select the best treatment strategy (see further in Section B).

#### **Primary outcome parameters:**

Auditory brainstem responses (ABRs) will be recorded to evaluate hearing thresholds at baseline level (day 0), during and at the end of the experiment (depending on the duration of the experiment, 7 to 28 days, selected from the pilot). With this outcome parameter we will measure the hearing loss induced by the deafening procedures.

Hair cell counts and ribbon synapse counts will be performed using immunofluorescence microscopy of whole cochlear mounts to evaluate the effect of selected ototoxic drugs on the cochlea.

#### **We will select the best dosage and route of administration of the cisplatin+furosemide to proceed with Experiment 1.**

**Experiment 1:** Here we aim to understand the expression levels of eCB and SPM components in normal hearing mice and whether they are modulated in cisplatin- or kanamycin- induced ototoxicity. For this, we will evaluate expression levels of eCB and SPM components in normal-hearing mouse cochleas, in animals deafened with kanamycin and in animals deafened in cisplatin. For that, we will treat young adult (aged 6-8 weeks) male and female C57BL6 mice with cisplatin or kanamycin (plus furosemide) to induce degeneration of hair cells and investigate the involvement of lipid signaling (receptors and enzymes) with respect to ototoxicity. The primary goal of our study is to understand the mechanisms underlying drug induced hearing loss pathologies and the study with this age group can be extended to both adults and children because both experience hearing loss after cisplatin and kanamycin. We will use normal-hearing animals (not ototoxically treated) as controls.

#### **Primary outcome parameters:**

The modulation of protein, transcripts or bioactive lipids of eCB and/or SPM components after kanamycin-induced hearing loss and cisplatin-induced hearing loss compared to normal hearing mice. The characterization of eCB and SPM components will be performed at protein level (western blots of whole cochlear extracts, immunofluorescence of cochlear whole mounts/cryosections to evaluate their localization in the cochlea), at transcription level (using Bulk RNA seq/ qPCR) and at the relative levels of the bioactive lipids (by mass spectrometry).

#### **Secondary outcome parameters:**

Auditory brainstem responses (ABRs) will be recorded to evaluate hearing thresholds at baseline level (day 0), during and at the end of the experiment (depending on the duration of the experiment, 7 to 28 days, selected from the pilot). With this outcome parameter we will measure the hearing loss induced by the procedures (see below).

Hair cell counts and ribbon synapse counts will be performed using immunofluorescence microscopy of whole cochlear mounts to evaluate the effect of selected ototoxic drugs on the cochlea.

## CISPLATIN

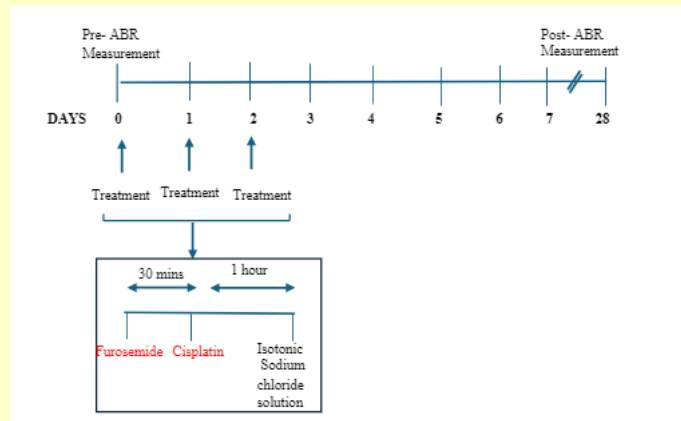


Figure 1: Example of schematic representation of deafening timeline for cisplatin in Experiment 1.

## KANAMYCIN

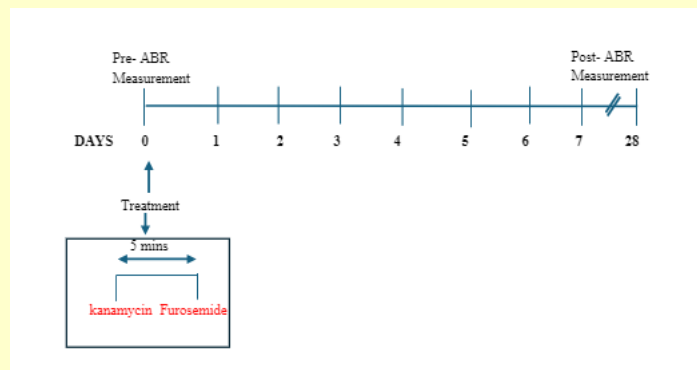


Figure 2: Schematic representation of deafening timeline for kanamycin in Experiment 1.

### GO/NO GO CRITERIA:

**GO:** If we observe a modulation in any of the eCB and SPM system components in any of the ototoxic methods (cisplatin or kanamycin), we will proceed to experiment 2. We will then choose one appropriate agonist/antagonist/siRNA of one of the modulated components (eCB or SPM) depending on which gives the highest modulation after ototoxic treatments. Here the modulation refers to both the quantitative levels of change in the components and their relevance. The bioactive lipid signaling components play distinct roles in different tissues and contexts. Only a few studies on eCBs and SPMs have been conducted in the cochlea. We intend to first characterize their levels in normal-hearing and deafened animals, and if one of the components is modulated at a significantly higher level (in terms of quantity) than the others, it would be interesting to understand its role. If we notice a minor change (in terms of quantity) in more than one component, we will determine which is more relevant and interesting to pursue based on the literature. For instance, if we see a set of components down-regulated in the same pathway (2-AG pathway/AEA pathway) and it corresponds to the mass spectrometry data, it will also be interesting to use these endogenous lipid agonists themselves to see effects on otoprotection. Hence, depending on the modulation observed we will proceed to select our treatment of choice.

**NO GO:** We will not proceed with experiment 2 if we observe no changes in any of the eCB and SPM system components after cisplatin and kanamycin ototoxic treatments.

**Experiment 2a:** In this experiment, the primary aim is to understand the potential otoprotective effects (against cisplatin and kanamycin induced ototoxicity) of agonists/antagonists/siRNAs of modulated components (receptors/enzymes) obtained from the characterization performed in the Experiment 1. We will select an appropriate agonist/antagonist/siRNA (that modulates the highest after cisplatin and kanamycin administration from Experiment 1) to treat cisplatin and kanamycin deafened animals to evaluate if those drugs are otoprotective. We will use 3 different dosages of the agonist/antagonist/siRNA and 2 routes of administration (trans-tympanic/intra cochlear) on both cisplatin and kanamycin deafened animals to select the best dosage and the route of administration.

**Primary outcome parameters:**

ABRs will be recorded to evaluate hearing thresholds at baseline level (day 0) and during/end after deafening depending on the duration of the experiment (selected from the pilot). With this outcome parameter we will evaluate if there is otoprotection in animals that were deafened and treated with the chosen approach.

Hair cell counts and ribbon synapse counts will be performed using immunofluorescence microscopy of whole cochlear mounts/cryosections to evaluate the otoprotective effect of the chosen approach compared to deafened mice.

**GO/NO GO CRITERIA:**

**GO:** We will proceed with experiment 2b only if we see otoprotection after administration of agonist/antagonist/siRNA against cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.

**NO GO:** We will not proceed with experiment 2b if we do not see otoprotection after administration of agonist/antagonist/siRNA against cisplatin and kanamycin induced ototoxicity

**Experiment 2b:** Our primary goal in this experiment is to understand the possible molecular mechanisms (general and specific) underlying cisplatin and kanamycin induced ototoxicity. We will select the best dosage and the route of administration from the experiment 2a and proceed with experiment 2b.

**Primary outcome parameters:**

The modulation of the transcripts/proteins of eCB and/or SPM components after kanamycin-induced hearing loss and cisplatin-induced hearing loss compared to normal hearing mice. The evaluation of eCB and SPM components will be performed at protein level (immunofluorescence of cochlear whole mounts/cryosections), at transcription level (using Bulk RNA seq/ qPCR).

### Timeline for CISPLATIN:

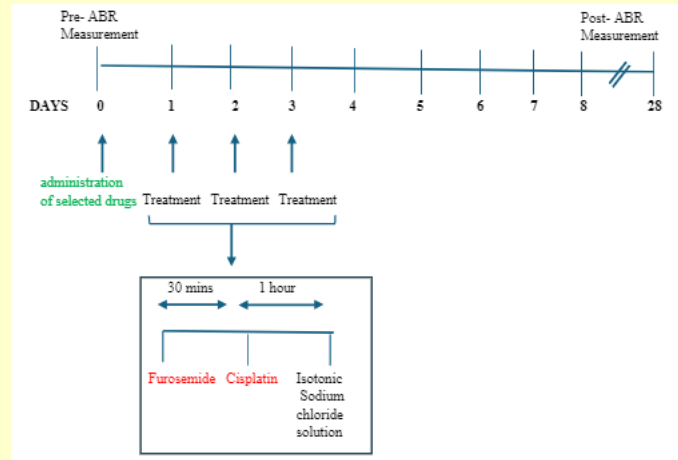


Figure 3: Schematic representation of treatment and deafening timeline for cisplatin in Experiment 2a, b.

### Timeline for KANAMYCIN:

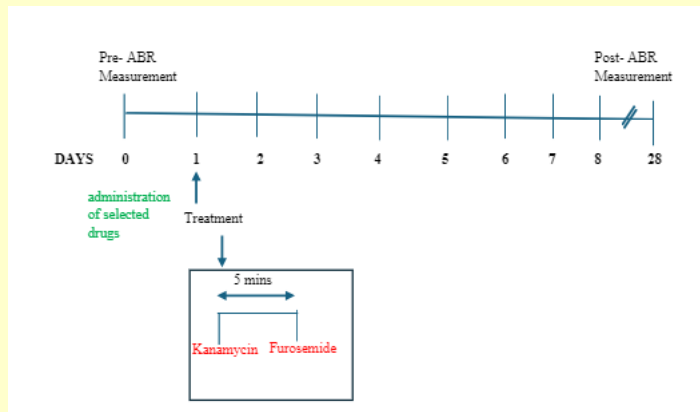


Figure 4: Schematic representation of treatment and deafening timeline for kanamycin in Experiment 2a, b.

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

**ABR recordings:** We will evaluate ABRs on deafened groups before and 7 days after deafening (Wang et al., 2023). ABRs are performed under isoflurane anesthesia. Three electrodes are placed subcutaneously (behind the pinna, in the head and in the leg) and click stimuli or pure-tone stimuli are presented in decreasing sound levels until the threshold for hearing is reached. For normal-hearing mice ABR measurements take about 30 minutes. For deafened mice ABR measurements take about 15 minutes. Each animal undergoes this procedure depending on the duration of the experiment which may vary between 7 and 28 days after ototoxic treatment.

**Deafening:** Hearing loss will be induced by treatment with ototoxic drugs

- **Ototoxicity-induced hearing loss by cisplatin:** The animals will be deafened by the administration of the combination of furosemide and cisplatin. After ABRs are performed, we will evaluate the specific concentration and treatment days that works best for this experiment in a pilot experiment using a small percentage of mice to refine the experiment. Animals will have hearing loss for the continuation of the experiment and welfare will be monitored depending on the duration of the experiment.

- **Ototoxicity-induced hearing loss by kanamycin:** The animals will be deafened by administration of kanamycin and furosemide after ABRs are performed. We have experience with ototoxicity-induced hearing loss in mice. Animals will have hearing loss for the continuation of the experiment and welfare will be monitored for the first 3 days after deafening and during/end depending on the duration of the experiment.
- **Trans-tympanic/Intra-cochlear administration of selective drugs:** Selected drugs(agonists/antagonists/siRNAs) targeting the eCB/SPMs receptors and enzymes will be administered as a pre-treatment under anesthesia 24 hours prior to the ototoxic treatments (cisplatin and kanamycin) unilaterally to try to induce otoprotective effects against ototoxicity induced damage (Bhatta et al., 2019).

### Sacrifice:

Immediately after the last ABR has been measured, deafened and deafened+treated animals will be sacrificed by asphyxiation using a CO<sub>2</sub> chamber and cochleas will be immediately dissected to acquire the primary outcome parameters and secondary outcome parameters listed in Experiments 1, 2a and 2b.

### References

Bhatta P, Dhukhwa A, Sheehan K, Al Aameri RFH, Borse V, Ghosh S, Sheth S, Mamillapalli C, Rybak L, Ramkumar V, Mukherjea D (2019) Capsaicin Protects Against Cisplatin Ototoxicity by Changing the STAT3/STAT1 Ratio and Activating Cannabinoid (CB2) Receptors in the Cochlea. *Sci Rep.* 9:4131. doi: 10.1038/s41598-019-40425-9.

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

### Statistical method employed for the calculation of sample size:

G-power 3.1.9.7 software was used to calculate the sample size. Note that before the start of each experiment we will align the sample size calculations with the statistician of the animal welfare body Utrecht.

N=11/group was the result calculated by the software, considering a large effect size (1.3) and a power of 0.8 (Two-tailed Student's *t*-test). For cisplatin and kanamycin induced hearing loss, we will factor into account the animals that may not respond to the ototoxic drugs (~20-25%). Hence, we will use N=14/group for both groups of cisplatin and kanamycin induced hearing loss. For pilot experiment and experiment 2a we will use N=11/group.

### For minimizing the number of animals:

1. For Experiment 1: we will use the same normal-hearing (non-treated) group for both treatments (kanamycin and cisplatin-induced ototoxicity). In addition, from the previous CCD licence AVD1150020186105 we will use some samples of kanamycin deafened cochleas for this study, hence reducing the number of animals requested.
2. For the experiment 2, we will use the data from experiment 1 for the deafened animals as controls.
3. We will also use contralateral ear as a control from the same animal.

### B. The animals

Specify the species, origin, life stages, estimated numbers, gender, genetic alterations and, if important for achieving the immediate goal, the strain.

Serial number	Species	Origin	Life stages	Number	Gender	Genetically altered	Strain
---------------	---------	--------	-------------	--------	--------	---------------------	--------

Click or tap here to enter text.	Mouse	Licensed breeder	6-8 weeks	782	Male and Female		C57BL/6
----------------------------------	-------	------------------	-----------	-----	-----------------	--	---------

Provide justifications for these choices

Species	We will use mice for these experiments because the deafening models we have experience with are almost the same to the acquired hearing loss that patients undergo with use of diuretics and antibiotics in the clinic (ototoxicity). We have experience with working with the C57BL/6J mice strain and in the context of our hearing loss model, this strain has been a choice of model for other research groups before.
Origin	We will breed the line in our animal facility because we have a HET Lgr5GFP transgenic breeding, and we only need the WT animals in this animal experiment. Hence, we can use the WT animals we do not use in the other Project (Stem cells from the inner ear-AVD11500202417856). If necessary, we will order C57BL/6J mice.
Life stages	To avoid age-related hearing loss interferences, we will use young adult mice in our studies. Yet, from a translational point of view, ototoxicity has debilitating effects on adult and pediatric patients and hence we aim to investigate the effects of protection against drug induced ototoxicity in such life stages.
Number	<p>The number of animals were calculated based on the following criteria:</p> <p><i>Due to the paucity of the tissue, we plan to pool 2 or more cochleas to have enough to perform some of the planned readouts.</i></p> <p><b>Pilot Experiment for cisplatin induced hearing loss:</b></p> <p>We will primarily set up a pilot experiment to determine the dosage, the route of administration, the days of the treatment, and possible gender difference.</p> <p>We will use 4 experimental groups, all four consisting of equal numbers of males and females:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Single administration of IV Furosemide + IP Cisplatin (Dose A)</li> <li>2. Single administration of IV Furosemide + IP Cisplatin (Dose B)</li> <li>3. Two or three administrations on consecutive days of IP Furosemide + IP Cisplatin (Dose A)</li> <li>4. Two or three administrations on consecutive days of IP Furosemide + IP Cisplatin (Dose B)</li> </ol> <p><i>IV: intravenous, IP: intraperitoneal</i></p> <p><b>Outcome parameters:</b> Here our aim is to select the best dosage the route of administration and the days of treatment. For this, after ototoxic treatments we will measure the ABR, and the hair cell counts to determine and evaluate the ototoxic damage.</p> <p>For this the number of animals required are provided below in Table 1.</p>

<b>Outcome parameter</b>	<b>Number of cochleas required</b>	<b>Total number of cochleas (N* number of cochleas required) (N=16)</b>	<b>Total number of mice per group (Number of cochleas /2)</b>	<b>Number of total mice for 4 groups</b>
Immunofluorescence (hair cell counts)	2	32	16	64

*Table 1: Number of animals for pilot experiment*

**Hence the total number of animals requested for our pilot experiment is 64**

After our pilot experiment we will select the appropriate course of treatment and proceed with the Experiment 1. In case the IV method with a single administration is at least as effective as the IP method, which has been shown in literature to cause hearing loss but requires three administrations on consecutive days, then we select the IV method.

**Experiment 1: Characterization of ECS and SPM signaling in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity:**

For this, we will utilize 3 experimental groups:

1. Normal-hearing animals
2. Cisplatin-induced hearing loss
3. Kanamycin-induced hearing loss

For **Experiment 1** we will perform western blotting, immunofluorescence, Bulk RNA seq or qPCR and mass spectrometry to evaluate the eCB and SPM system components. We would like to perform all these readouts mentioned above since this is the primary characterization of these bioactive lipid components in this model.

On this basis, we calculated the number of animals as follows:

**Normal-hearing controls:**

<b>Outcome parameter</b>	<b>Number of cochleas required</b>	<b>Total number of cochleas (N* number of cochleas required) (N=11)</b>	<b>Total number of mice per group (Number of cochleas /2)</b>	<b>Number of total mice for 1 group</b>	<b>Number of total mice for studying eCB +SPM (Number of total mice *2)</b>
qPCR/RNA-seq	2	22	11	11	22
Immunofluorescence	2	22	11	22	22
Western blotting	4	44	22	22	44
Mass spectrometry	2	22	11	11	22

*Table 2: Number of animals for normal-hearing controls*

**Cisplatin and kanamycin induced hearing loss:**

<b>Outcome parameter</b>	<b>Number of cochleas required</b>	<b>Total number of cochleas (N* number of cochleas required) (N=14)</b>	<b>Total number of mice per group (Number of cochleas /2)</b>	<b>Number of total mice for 2 groups (group cisplatin and group kanamycin)</b>	<b>Number of total mice for studying eCB +SPM (Number of total mice *2)</b>
Immunofluorescence (hair cell counts)	2	28	14	14 (cryosections of Kanamycin induced hearing loss can be taken from our previous license)	28
qPCR/RNA-seq	2	28	14	28	56
Western blotting	4	56	28	56	112
Mass spectrometry	2	28	14	28	56

*Table 3: Number of animals for cisplatin and kanamycin induced hearing loss*

**Normal-hearing animals:** We will use 110 mice in total (see Table 2).

**Cisplatin and kanamycin-induced hearing loss:** We will use a total of 252 animals (see table 3). For the kanamycin induced hearing loss we will not request animals for immunofluorescence since we will use the cochlear cryosections collected from our previous license.

**Hence the total number of animals requested for experiment 1 is: 362**

**We will proceed with experiment 2 only if we observe modulation in the eCB and SPM system components after ototoxicity by cisplatin and kanamycin.**

**Experiment 2a:**

The aim of this experiment is to determine the dosage, route of administration and treatment strategy of the agonists/antagonists/siRNA to evaluate the possible otoprotective effects.

We will use 12 experimental groups (3 different dosages of agonists/antagonists/siRNA, 2 different routes of administration and 2 ototoxic treatments):

1. Cisplatin treated + Trans-tympanic agonist/antagonist/siRNA Dose A
2. Cisplatin treated + Trans-tympanic agonist/antagonist/siRNA Dose B
3. Cisplatin treated + Trans-tympanic agonist/antagonist/siRNA Dose C
4. Cisplatin treated + Intra-cochlear agonist/antagonist/siRNA Dose A
5. Cisplatin treated + Intra-cochlear agonist/antagonist/siRNA Dose B
6. Cisplatin treated + Intra-cochlear agonist/antagonist/siRNA Dose C
7. Kanamycin treated + Trans-tympanic agonist/antagonist/siRNA Dose A
8. Kanamycin treated + Trans-tympanic agonist/antagonist/siRNA Dose B
9. Kanamycin treated + Trans-tympanic agonist/antagonist/siRNA Dose C
10. Kanamycin treated + intra-cochlear agonist/antagonist/siRNA Dose A
11. Kanamycin treated + intra-cochlear agonist/antagonist/siRNA Dose B
12. Kanamycin treated + intra-cochlear agonist/antagonist/siRNA Dose C

**Outcome parameters:** Here our aim is to select the best dosage and the route of administration. For this, after treatments with agonist/antagonist/siRNA on cisplatin and kanamycin deafened animals, we will measure the ABR, and the hair cell counts to determine and evaluate the otoprotection of the administered agonist/antagonist/siRNA of the selected target.

**For this the number of animals is listed below in Table 4:**

<b>Outcome parameter</b>	<b>Number of cochleas required</b>	<b>Total number of cochleas (N* number of cochleas required) (N=11)</b>	<b>Total number of mice per group (Number of cochleas /2)</b>	<b>Number of total mice for 12 groups</b>
Immunofluorescence (hair cell counts)	2	22	11	132

*Table 4: Number of animals for experiment 2a*

**Hence the total number of animals requested for our experiment 2a is 132**

We will proceed to experiment 2b only if we observe otoprotection after administration of the agonists/antagonists/siRNA in experiment 2a. We will select the best dosage and the route of administration which yields otoprotection compared to deafened animals.

**Experiment 2b:** We aim to understand possible molecular mechanisms (general and specific) underlying cisplatin and kanamycin induced hearing loss after administration of agonists/antagonist/siRNA. We will select one dosage and the route of administration based on the outcomes of experiment 2a for both cisplatin and kanamycin induced hearing loss.

For this we will utilize 4 experimental groups as follows:

1. Cisplatin induced hearing loss +agonist/antagonist/siRNA
2. Cisplatin induced hearing loss+ vehicle of agonist/antagonist/siRNA
3. Kanamycin induced hearing loss+ agonist/antagonist/siRNA
4. Kanamycin induced hearing loss+ vehicle of agonist/antagonist/siRNA

For **Experiment 2b**, we will only perform immunofluorescence and Bulk RNA seq or qPCR to evaluate the eCB and SPM system components. We choose to perform only these two readouts since after administration of the agonist/antagonist/siRNA we are only interested in understanding the molecular mechanisms underlying the otoprotective effects mediated by the drug. In addition, performing a Bulk RNA seq can provide a vast knowledge of the effects on the transcriptome and requires pooling of only 2 cochleas. From the bulk RNA seq data, we will select the modulated eCB and SPM system components at a gene level to see if there are any differences in their localization and expression patterns at a protein level through immunofluorescence. Furthermore, since western blotting requires pooling of 4 cochleas, we chose immunofluorescence to understand the effects of the drug at a protein level, thereby reducing the number of animals requested.

On this basis, we calculated the number of animals as follows:

Outcome parameter	Number of cochleas required	Total number of cochleas (N* number of cochleas required ) (N=14)	Total number of mice per group (Number of cochleas /2)	Number of total mice for 4 groups	Number of total mice for studying eCB +SPM (Number of total mice *2)
Immunofluorescence	2	28	14	56	112
qPCR/RNA-seq	2	28	14	56	112

*Table 5: Number of animals for Experiment 2b*

	<p>Hence the total number of animals requested for experiment 2b is 224</p> <p>In Experiment 2a,b we will re-use the data from deafened mice from Experiment 1 as controls, hence reducing the number of animals.</p>
Gender	<p>We will use male and female mice. Female mice (and humans) are less susceptible to hearing loss (by ototoxicity) than male mice. We have evaluated in a previous (unpublished) study which dose of kanamycin allows to induce hair cell loss and hearing loss to the same extent in female as in male mice. We have observed that 900 mg/kg kanamycin + furosemide in females gives the same hearing loss and hair cell loss as 700 mg/kg kanamycin + furosemide in males. Hence we use both genders but with different doses of kanamycin.</p>
Genetic alterations	<p>Not applicable</p>
Strain	<p>The C57BL/6J mouse strain is a good model for hearing loss since it resembles ototoxicity very well, both for kanamycin and cisplatin. In our lab, we have optimized the ototoxicity protocol (furosemide + kanamycin) to match the effects seen in patients when they receive the combination of these two drugs, validating the choice of the strain for these types of experiments. In other labs, the cisplatin treatment has been shown to cause substantial hearing loss as seen in human patients (Ruhl et al., 2019). Moreover, to use the same strain for both kanamycin and cisplatin has the advantage of using the same normal-hearing control group.</p> <p><b>Reference</b>  Ruhl D, Du TT, Wagner EL, Choi JH, Li S, Reed R, Kim K, Freeman M, Hashisaki G, Lukens JR, Shin JB (2019) Necroptosis and apoptosis contribute to cisplatin and aminoglycoside ototoxicity. J Neurosci. 39:2951-2964. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1384-18.2019.</p>

### C. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

Yes

No > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices

[Click or tap here to enter text.](#)

### D. Pain and compromised animal welfare

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No

Yes > Will anaesthesia, analgesia or other pain relieving methods be used?

No > Justify why pain relieving methods will not be used.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Indicate what relieving methods will be used and specify what measures will be taken to ensure that optimal procedures are used.

Mice treated with ototoxic treatments will be monitored for their health status regularly. Appropriate hydration care and supportive treatments will be provided to ensure minimal suffering.

Describe which other adverse effects on the animals' welfare may be expected?

Cisplatin could cause nephrotoxicity or acute kidney injury of varying severity in a dose-dependent manner. Cisplatin will also cause ototoxicity, gastrointestinal ototoxicity, neurotoxicity and gonadotoxicity. Cisplatin could also cause muscle wasting and anemia (Perše, 2021).

Kanamycin can cause weight loss.

Surgery has a limited risk for infections, in spite of careful sterile conditions.

## Reference

Perše M (2021). Cisplatin mouse models: Treatment, toxicity and translatability. *Biomedicines* 9:1406. doi: 10.3390/biomedicines9101406.

Explain why these effects may emerge.

**Deafening using cisplatin:** Cisplatin is one of the highly utilized chemotherapeutic drug in several adult and paediatric malignancies. However, it causes several adverse effects. Chemotherapy induces loss of muscle, loss of appetite, and excessive weight loss due to several molecular mechanisms including alteration of lipid metabolism, protein degradation pathways, and oxidative stress (Conte et al., 2020; Kim et al., 2022). In addition, the diuretic furosemide can cause a reduction in weight. We will monitor the animals by weighing them for the first three days after the ototoxic treatment and will decide for the next days depending on their rate of recovery. We will also observe them during the treatment to monitor their health status. We expect a low mortality risk based on literature (see Section E).

**Deafening using kanamycin:** Ototoxic deafening can cause a reduction in weight due to the fact that furosemide is a diuretic. Animals will be monitored during the course of the treatment for the continuation of the experiment. A small number of animals (less than 1%) might die due to the ototoxic medication (kanamycin and/or furosemide). In our experiments over the past 3 years, we lost 1 out of 300 mice after kanamycin/furosemide treatment.

**Intracochlear administration of selected drugs:** The intracochlear microinjection is a surgical procedure performed under general anaesthesia and therefore infections can occur on the wound site. This procedure will be conducted by an expert, to minimize the impact on welfare of the animals and under sterile conditions to prevent infection. Animals will undergo pain while the surgical wound heals. Animals will be administered pain relief medication to prevent them from suffering.

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

**Deafening using cisplatin:** We have incorporated a concentration of furosemide along with cisplatin to reduce the amount of cisplatin administered as way to prevent suffering of animals. We will perform routine monitoring of animals after treatment with cisplatin and provide them with necessary nutrition and hydration if needed. We will select the dosage/days of the treatment depending on the pilot study. We will refine our protocol depending on our pilot to select a treatment regimen which causes minimal suffering. We will apply the humane endpoints as determined in the pilot.

**Deafening using kanamycin:** we use a concentration of kanamycin and furosemide that allows to deafen the animals but is not severely toxic. We have refined our protocols to use the lowest doses of drug to minimize unnecessary discomforts of the animals.

Note: furosemide is administered along with the ototoxic drug (cisplatin/kanamycin) in order to enhance the effect of the ototoxic drug and to minimize the needed number of administrations of the drug (once for kanamycin, maximally three times for cisplatin) and thus reduce discomfort.

**Intracochlear/Trans-tympanic administration of selected drugs:** We will work in a sterile environment to reduce chances of infection. We have all been trained to work in sterile conditions as part of our work. We will perform this procedure under anesthesia with proper pain management. We have experience with this procedure from our previous studies.

## E. Humane endpoints

May circumstances arise during the animal procedures which would require the implementation of humane endpoints to prevent further distress?

No > Continue with question F

Yes > Describe the criteria that will be used to identify the humane endpoints.

- If the animals lose 25% of their weight for 24 hours and their drinking behaviour is insufficient (monitored first 3 days and depending on the days of the experiment) humane end point will be reached, and animals will be killed.
- Welfare of the animals will be monitored by visual inspection, if animals are not showing signs of being healthy (judged on skin condition, drinking behaviour, motility, and weight) humane end point will be reached (after consultation with specialist in the animal facility) and animals will be killed.
- If the animals get an infection after surgery, humane endpoint will be reached (after consultation with specialist in the animal facility) and animals will be killed.

Indicate the likely incidence.

Kanamycin: < 1%

Cisplatin: We do not have experience with cisplatin mouse models to indicate an average incidence of getting to HEPs. From the literature it is known that the mortality rate depends on the dosage (Low dose cisplatin 0/8 (no weight loss was observed), high dose- 4/8 (15-30% weight loss) (Perše et al., 2018).

## References

Conte E, Bresciani E, Rizzi L, Cappellari O, De Luca A, Torsello A, Liantonio A (2020) Cisplatin-Induced Skeletal Muscle Dysfunction: Mechanisms and Counteracting Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci.* 21:1242.

Kim GT, Kim EY, Shin SH, Lee H, Lee SH, Park K, Sohn KY, Yoon SY, Kim JW (2022) PLAG alleviates cisplatin-induced cachexia in lung cancer implanted mice. *Transl Oncol.* 20:101398.

Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-Induced Rodent Model of Kidney Injury: Characteristics and Challenges. *Biomed Res Int.* 2018; 2018:1462802. Published 2018 Sep 12. doi:10.1155/2018/1462802

Perše M (2021). Cisplatin Mouse Models: Treatment, Toxicity and Translatability. *Biomedicines* 9:1406. doi: 10.3390/biomedicines9101406.

## F. Classification of severity of procedures

Provide information on the experimental factors contributing to the discomfort of the animals and indicate to which category these factors are assigned ('non-recovery', 'mild', 'moderate', 'severe'). In addition, provide for each species and treatment group information on the expected levels of cumulative discomfort (in percentages).

Discomfort levels per procedure:

Auditory Brainstem Responses (ABRs) under light anaesthesia: mild

Deafening:

- Ototoxic (kanamycin) treatment: moderate
- Ototoxic (cisplatin) treatment: moderate

To account for rare cases of death in the deafening procedure (<1%), we consider ~1% severe.

Intracochlear administration of selected drugs: moderate

Killing: mild

Cumulative discomfort per experimental group

### Pilot

Deafened groups: 99% moderate: 63 mice  
1% severe: 1 mouse

### Experiment 1

Normal hearing group: 100% mild 110 mice  
Deafened groups: 99% moderate: 249 mice  
1% severe: 3 mice

#### Experiment 2a

Deafened groups: 99% moderate: 131 mice  
1% severe: 1 mouse

#### Experiment 2b

Deafened+treated group: 99% moderate: 222 mice  
1% severe: 2 mice

In summary, the numbers and percentages per category discomfort are mild: 110 (14.1%), moderate: 665 (85.0%) and severe: 7 (0.9%).

### G. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Replacement

We have started to evaluate the possible modulation of eCBs and SPMs in *in vitro* models of hair cells. Although the results we obtained are encouraging, they are limited to a single cell type and exclude the complex interactions between the multiple cell populations of the organ of Corti, as well as the systemic implications (which are of crucial importance in the context of inflammatory processes and ototoxicity of systemically-administered drugs).

The cellular composition of the inner ear is diverse, containing over fifty distinct cellular subtypes, including hair cells, supporting cells, non-sensory epithelial cells, as well as unique neurons and mesenchymal populations (Van der Valk et al., 2021). Currently there are no *in vitro/ex vivo* models, neither the UB/OC1 cell line (the *in vitro* model applied by our collaborators [REDACTED] nor the organoid model in our lab in Utrecht, that comprises all the cell types and the complex cellular architecture present in the cochlea.

Therefore, in accordance with the application of the "3R" principle and to obtain the desired results, the use of complex experimental *in vivo* models is an obligatory choice. The study of neuroinflammatory phenomena linked to the modulation of eCBs and SPMs in the cochlea necessarily requires the use of animal models that can mimic as much as possible the neurodegenerative and dysfunctional mechanisms that are established in a complex system and for which there are currently no equally alternative models valid. The use of the C57BL/6J mouse model is widely accredited and consolidated in scientific literature, and is the main genetic background used to generate transgenic mice. The use of mouse models is essential for studying the effects of pharmacological compounds (receptor inhibitors and agonists) on the progression of the disease and on the ability to resolve inflammation. Since this is a study on the physiological, biochemical, molecular, and cognitive determinants associated with the impact of ototoxic agents in cochlear neurodegenerations, it may not be possible to obtain the same data on other experimental models (for example, in cell culture models). Therefore, the experiments that have been indicated in this proposal are not currently replaceable with another scientifically valid method that is an alternative to animal testing.

Reference

	van der Valk WH, Steinhart MR, Zhang J, Koehler KR (2021) Building inner ears: recent advances and future challenges for in vitro organoid systems. Cell Death Differ 28:24-34. doi: 10.1038/s41418-020-00678-8.
Reduction	<p>The number of animals indicated in the proposal is necessary to obtain scientifically valid data from a statistical point of view, considering the normal biological variability in this type of protocol. In this research project we aim to use the smallest number of animals compatible with the proposed objectives and according to the required statistical analysis.</p> <p>To have statistically valid results and at the same time try to limit the number of animals to be used for this experiment, variability will be reduced by monitoring different parameters. First, animals of the same age will be used, in order to limit age-related variables. Moreover, animals will be screened for normal hearing before the start of the experiments through ABR recordings.</p> <p>In addition, we will use female and males, and use WT from our breeding that otherwise would be killed before using in experiments.</p> <p>We record ABRs before deafening, which will provide a within-animal reference of normal hearing. For comparison of histology and molecular analyses we can compare to the data in normal-hearing mice in previous publications. We will also use cryosections of deafened mouse cochleas that have been collected in license number AVD1150020186105 and hence will request less animals here.</p>
Refinement	<p>The experiments described in this research project will follow proper monitoring paradigms and pain management procedures where necessary. The animals subjected to the experiments are kept in an environment suitable for their health and well-being and all measures are adopted to promptly correct any defects or suffering that may be found. Aids and environmental enrichments are added to the cages to increase the animal's sensory enrichment and to make the environment as comfortable as possible. All the treatments foreseen by the project are carried out by competent researchers in close collaboration with the animal facility staff who observe the animals daily to evaluate normal behaviour and any signs of stress (hair quality, age-appropriate weight, etc.) and monitor the environmental conditions of housing (temperature, humidity and ventilation).</p>

Are adverse environmental effects expected? Explain what measures will be taken to minimise these effects.

No

Yes > Describe the environmental effects and explain what measures will be taken to minimise these effects.

Click or tap here to enter text.

#### H. Re-use

Will animals be used that have already been used in other animal procedures ?

No > Continue with question I.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

Click or tap here to enter text.

### I. Repetition

Explain for legally required animal procedures what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, describe why duplication is required.

N.A.

### J. Location where the animals procedures are performed

Will the animal procedures be carried out in an establishment that is not licenced by the NVWA?

No > Continue with question K.

Yes > Describe this establishment.

Provide justifications for the choice of this establishment. Explain how adequate housing, care and treatment of the animals will be ensured.

[Click or tap here to enter text.](#)

## 3. End of experiment

### K. Destination of the animals

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Provide information on the destination of the animals.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

We will have to sacrifice the animals during the procedures only if they reach humane end point (category to select this has been mentioned above in section E-humane end points). At the end of the experiment, we will have to sacrifice the animals to obtain the cochleas to study our research questions.

Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

No > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

[Click or tap here to enter text.](#)

Yes > Will a method of killing be used for which specific requirements apply?

No > Describe the method of killing.

### CO2 asphyxiation

Yes > Describe the method of killing that will be used and provide justifications for this choice.

[Click or tap here to enter text.](#)

If animals are killed for non-scientific reasons, justify why it is not feasible to rehome the animals.

[Click or tap here to enter text.](#)

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : AVD11500202418278
2. Titel van het project : Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss
3. Titel van de NTS : Bescherming van gehoor en behandeling van gehoorverlies

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 06-31118069
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 02-08-2024
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 07-08-2024
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot: 13-08-2024 / 04-09-2024
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 17-09-2024

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

## 8. Eventueel horen van aanvrager

- Datum: 07-08-2024
- Plaats: Utrecht
- Aantal aanwezige DEC-leden: 5
- Aanwezige (namens) aanvrager: Verantwoordelijk onderzoeker
- Gestelde vragen en verstrekte antwoorden: De DEC heeft de onderzoekers o.a. gehoord over het type onderzoek, de alternatieven voor dierproeven, de gebruikte middelen, en het ongerief. Hieruit zijn onderstaande vragen, zoals vermeld bij punt A9, voortgekomen, die schriftelijk aan de onderzoekers werden voorgelegd.
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag.

## 9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 13-08-2024

- Datum antwoord: 04-09-2024
- Strekking gestelde vragen en antwoorden:

#### *Projectvoorstel*

#### 3.1 Achtergrond

U heeft aangegeven dat het om fundamenteel en translationeel onderzoek gaat, maar ligt de focus niet op fundamenteel onderzoek?

*Antwoord: Yes, fundamental (with the clinical application on the horizon).*

Kunt u aangeven waarom u twee modellen wilt onderzoeken, en dus meer dieren nodig heeft? De DEC begrijpt de keuze voor cisplatine, aangezien dit onmisbaar is in de kindergeneeskunde. Kunt u de meerwaarde voor kanamycine beargumenteren? De cellulaire/moleculaire werkingsmechanismen van cisplatine en aminoglycosiden zijn heel verschillend. Verwacht u meerwaarde van bestudering van mogelijke preventie of therapie voor beide klassen verbindingen, of zijn dit min of meer parallelle studies (waarvoor dan ook afzonderlijk onderbouwing vereist is)?

*Antwoord: Cisplatin belonging to the class of chemotherapeutics and kanamycin instead to the aminoglycoside antibiotics belong to the major class of drugs causing ototoxicity. One of the important questions that we would like to address in our study is the possible similarities and differences in the mechanism of action of these ototoxic drugs, i.e., involvement of similar/different components of the eCB/SPMs. This can provide useful insights into future development in therapeutics against drug induced ototoxicity. We have chosen specifically cisplatin and kanamycin because:*

*(i) Cisplatin is one of the most used and the effective first-line chemotherapeutic for treating many malignant solid tumours in both adults and children currently in practice. It causes ototoxicity in about with 40%–60% of patients having various degrees of hearing loss and 18% facing severe to profound hearing loss after cisplatin treatment.*

*(ii) Kanamycin on the other hand, although having other alternatives in industrialized countries, is still used in developing nations due to its cost effective nature (Sagwa et al., 2015; Dillard et al., 2021). It is also noteworthy to mention that our lab has expertise and has developed kanamycin hearing loss animal models (mice: AVD1150020186105; guinea pigs: AVD11500201550, AVD1150020174315). Choosing another aminoglycoside antibiotic other than kanamycin would require to set up a new model with various parameters (dosage, route of administration, days of treatment). This will lead to increased usage of animals. Hence, studying kanamycin would be a better choice. Importantly, findings with kanamycin could be translatable to other aminoglycosides and non-aminoglycoside antibiotics due to their similar mechanisms of action (Rybak et al., 2021) and could give important insights on the bioactive lipid targets involved in ototoxicity in general by comparing to the findings in cisplatin ototoxicity. See also at question 3.3.*

3.2 Doel: Kunt u het doel bij 3.2.1 verduidelijken? Het uiteindelijke doel is voor de DEC wel helder beschreven.

*Antwoord: Immediate goals:*

- (i) To investigate which class of bioactive lipids (eCB/SPM/both) are involved in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.*

- (ii) *To investigate which components(receptors/enzymes/both) of the eCB/SPM are involved in cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.*
- (iii) *To characterize the effect size of the observed modulation (if any) of the components of the eCB/SPM after ototoxicity.*
- (iv) *To characterize the direction of the modulation (if any), i.e., upregulation or downregulation of the components of the eCB/SPM system after ototoxicity.*
- (v) *To investigate the similarities/differences in the response to bioactive lipid components after cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.*
- (vi) *To investigate the possible putative otoprotection mediated by the selected agonist/antagonist/siRNA against cisplatin and kanamycin induced hearing loss*
- (vii) *To investigate the mechanisms (similar/ different) underpinning the bioactive lipid response after cisplatin and kanamycin induced ototoxicity.*

3.3 Belang: Kunt u aangeven wat de incidentie is van gehoorverlies bij patiënten die behandeld zijn met ototoxische geneesmiddelen? Zijn uw resultaten ook van belang voor mensen met gehoorverlies veroorzaakt door andere ototoxische stoffen?

*Antwoord: Chemotherapy with cisplatin to treat cancer leads to hearing loss in about 60% of the patients (Tan & Vlajkovic, 2023; Meijer et al., 2022; Sanchez et al., 2024). In 18% of the patients the hearing loss is severe to profound, which then requires expensive care with a cochlear implant to (partially) restore hearing. It is estimated that annually worldwide 500.000 patients suffer hearing loss after cisplatin treatment (Sanchez et al., 2024).*

*Kanamycin along with other aminoglycosides is an antibioticum that is used to treat drug-resistant tuberculosis. The treatment causes hearing loss in about 50% of the patients. An estimated 50.000 patients worldwide annually acquire hearing loss after aminoglycoside treatment (Dillard et al., 2021).*

*Comparison of the two different ototoxic drugs allows us to examine general molecular mechanisms regarding the bioactive lipids, which can be targeted as a means to counter ototoxicity in general. In other words, the comparison tells us about generalizability.*

3.4 Strategie: U hanteert go/no go-criteria. Kunt u daarbij vermelden hoe groot effecten moeten zijn om naar de volgende stap (go) te gaan? Zou het ook mogelijk zijn om meer *in vitro* of *ex vivo* vooronderzoek te doen, zodat u minder hoeft te testen in levende dieren?

Kunt u hier dan ook een go/no go voor formuleren?

*Antwoord: We will apply a criterion of >20% difference in protein expression levels of bioactive lipids for the Go from experiment 1 to experiment 2a. Note we observed a down regulation of protein expression levels after cisplatin treatment in the in vitro study of about 40% (enzyme DAGL  $\beta$ ) and 25% (receptor CB2). The criterion for a Go from experiment 2a to experiment 2b is > 10 dB improvement in hearing threshold as measured by auditory brainstem responses.*

*If we observe only one component modulated, we will proceed our next step (Experiment 1 to 2a) with that component. If we observe 2 or more components modulated at a different rate with a large difference (e.g.: one with 30% increase/decrease other with 70% increase/decrease) we will go with the one that modulates at a greater rate. If we observe 2 or*

more components with very similar rates of modulation, we will go with the component based on the availability/practicality of commercially available agonists/antagonists, well-studied literature, similarities with the *in vitro* study performed. A cocktail of 2 or more components will not be possible because of the following: 1) Unknown interaction of the selected drugs, 2) Would not be possible to differentiate the effects between the 2 drugs (if needed to do so, will require more animals to understand individual effects). Since, the bioactive lipid system is not well studied in the context of inner ear, this would be our best course of action.

Since there are currently only a handful of studies on the presence and involvement of eCBs/SPMs in cochlea in physiological and conditions of drug induced hearing loss, we selected an *in vitro* cell line (UB/OC1) to primarily characterize the bioactive lipid signalling in physiological and ototoxic conditions (after cisplatin treatment). We found some of the components to be expressed in the cell line and modulated in response to cisplatin induced ototoxicity. This model can only be used as a preliminary step in understanding the bioactive lipid signalling in hair cell-like cells but cannot be substituted or translated entirely for an *in vivo* environment because of the following. 1) This cell line is a mouse immortalized E13 organ of Corti derived hair cell precursor and they have only certain hair cell-like characteristics and cannot be differentiated to cell type specific hair cells present in the cochlea such as inner/outer hair cells and hence can only provide a general picture. 2) This *in vitro* model does not contain the other cell types present in the cochlea such as supporting cells, vasculature, and immune cells. Hence, the response of bioactive lipid signalling might be entirely different.

Therefore, studying the effects of agonists/antagonists on the *in vitro* model and their outcomes cannot be a go/no go criteria for proceeding with our next step since it cannot recapitulate the *in vivo* environment. In addition, currently there are no alternatives carrying the complexity (different cell types, developmental stage) of the cochlear structures to study ototoxicity and develop drug screening.

### *Bijlage 1*

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

Kunt u aangeven welke parameters u meet?

*Antwoord: It is described in the Description animal procedures. We summarize here below:*

*For the pilot experiment:*

*ABR thresholds in dB relative to normal.*

*Hair cell counts and synaptic ribbon counts.*

*For experiment 1:*

*Characterization of eCB and SPM components at a protein level (Western Blot, immunofluorescence), at a transcription level (using Bulk RNA seq or qPCR) and at the relative levels (mass spectrometry).*

*For experiment 2a:*

*ABR thresholds in dB relative to normal.*

*Hair cell counts and synaptic ribbon counts.*

*For experiment 2b:*

*Characterization of eCB and SPM components at a protein level (immunofluorescence), and at a transcription level (using Bulk RNA seq or qPCR).*

#### D. Pijn en welzijnsaantasting

Furosemide wordt toegediend om het ototoxisch effect te versterken en veroorzaakt zelf voornamelijk reversibele effecten. De cellen worden vatbaarder voor kanamycine waardoor een lagere dosis kanamycine nodig is. Kunt u nader toelichten waarom hiervoor diuretica gebruikt worden? En blijft het doofheidsmodel nog valide in vergelijking met de humane situatie waar geen diuretica worden toegediend?

*Antwoord: The diureticum lowers the blood-cochlea barrier facilitating kanamycin to enter the cochlea and subsequently enter the hair cells through the ion channels. The damage to the hair cells is caused by the kanamycin and not by the furosemide (the used diureticum). After co-administration of kanamycin and furosemide hearing deteriorates during an hour due to action of furosemide, recovers and subsequently (after 3 to 48 hours) it severely deteriorates due to action of kanamycin (Versnel et al., 2007). This time course shows the permanent effect is caused by kanamycin, and that way it is comparable to the cumulative effect of daily administrations of kanamycin. The reason for single administration of kanamycin and furosemide instead of multiple administrations of kanamycin is substantial reduction of discomfort.*

Er ontbreekt een 'vinkje' terwijl de toelichting wel gegeven wordt. Wilt u dit checken en zo nodig aanpassen?

*Antwoord: Yes, checked.*

#### E. Humane eindpunten

Een humaan eindpunt is als de dieren meer dan 20-25% gewichtsverlies hebben en onvoldoende drinken. Wilt u specifiek aangeven welk percentage u wilt aanhouden? Kunt u uw keuze onderbouwen? 20% of meer gewichtsverlies wordt algemeen beschouwd als hoog en dient gerechtvaardigd te zijn binnen de context van de proef. De DEC vraagt zich tevens af of waarom aan beide voorwaarden moet worden voldaan. Is het gewichtsverlies niet voldoende als humaan eindpunt?

*Antwoord: We will apply 25% weight loss for a duration of 24 hours while the animals do not show spontaneous drinking behaviour. The weight of mice varies to relatively large extents and therefore large modulations in weight can occur without causing discomfort. Following the advice of the IvD we added the condition of the drinking behaviour because sufficient drinking after considerable weight loss (25%) is expected to lead to fast recovery. A temporary weight loss is typically observed after administration of diureticum.*

U vermeldt '., if animals are not showing signs of being healthy humane end point will be reached ....' De DEC vindt dit onvolledig. Wilt u verwijzen naar een standaard scorelijst of specifiek de criteria hiervoor benoemen?

*Antwoord: The criteria are skin condition, drinking behaviour, motility, and weight. The humane endpoint scores will be finalized in consultation with the IvD when preparing the working protocol.*

#### F. Classificatie van ongerief

Voor de ABR krijgen de dieren anesthesie. Kunt u aangeven hoe vaak en met welke

frequentie de dieren anesthesie krijgen toegediend? Wilt u overwegen de anesthesie op te nemen als ongerief en de mate van (cumulatief) ongerief vermelden?

*Antwoord: The discomfort level of the ABR recordings is assessed with anaesthesia included in the ABR procedure. The purpose of the anaesthesia is to prevent discomfort resulting from placing the needle electrodes in the skin. The anaesthesia is light (compared to that applied for surgery). The ABR recordings are performed maximally 3 times (baseline, after ototoxic treatment, at end of experiment).*

De DEC vermoedt dat er kans is op nierschade door de diuretica. Kunt u aangeven in welke mate u nierschade verwacht bij de behandelde muizen en wat het ongerief is, en daarbij referenties opgeven ter onderbouwing?

*Antwoord: In our previous study in which mice were treated with kanamycin and furosemide (AVD1150020186105) we did not observe discomfort resulting from furosemide. Less than 1% of the mice reached humane endpoint. The animals lose weight after furosemide administration which is countered by hydration. The mice are closely monitored the first three days after furosemide administration. In fact, furosemide significantly reduces nephrotoxic effects of cisplatin (Li et al., 2011).*

U geeft aan dat de dieren ernstig ongerief kunnen ervaren. De DEC vraagt zich af of het ernstig ongerief niet voorkomen wordt door het toepassen van de humane eindpunten. Wilt u dit nagaan en eventueel de mate van ongerief aanpassen?

*Antwoord: The intention is to kill animals at the humane end point before they reach severe discomfort, by close monitoring of the animals. Based on the previous study (AVD1150020186105) the risk of animals actually reaching severe discomfort is thus reduced to 1%. However, severe discomfort cannot always be avoided, but the duration of severe discomfort can be reduced by applying the humane endpoint.*

G. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC heeft met u gesproken over mogelijke alternatieven voor de dierproeven, zoals celkweken, explants en organoïdenkweken. U heeft aangegeven al bezig te zijn met de ontwikkeling van een organoïde en u daarnaast de *in vitro* mogelijkheid met agonisten en antagonist binnen uw onderzoeksgroep wilt bespreken. Kunt u de onderzochte alternatieven vermelden?

*Antwoord: We have discussed in our research group the status of the organoid model in our lab and the in vitro model used by our [REDACTED]. The cellular composition of the inner ear is remarkably diverse, containing over fifty distinct cellular subtypes, including hair cells, supporting cells, non-sensory epithelial cells, as well as unique neurons and mesenchymal populations (Van der Valk et al., 2021). Currently there are no in vitro/ex vivo models that comprises all the cell types and the complex cellular architecture present in the cochlea.*

*The UB/OC1 cell line ([REDACTED]) is an E13 mouse hair cell precursor organ of Corti cell line that contains certain hair cell like characteristics. The cochlea's sensory component consists of inner and outer hair cells, each of which plays a distinct function in hearing. These specific hair cell types cannot be generated from the UB/OC1 cell line. Furthermore, drug-induced ototoxicity is a result of multiple cochlear structures and cell types functioning synergistically in addition to hair cells. Thus,*

*while the application of agonists/antagonists in this cell line can provide insights into their effect on hair cells, it cannot provide a complete picture of the effect on the cochlea. The mechanistic study (Experiment 2b), examining among others inflammation, cell death pathways and oxidative stress require input from a variety of cell structures in the cochlea. As a result, the response of the agonist/antagonist to the in vitro model after ototoxic treatment can be different from an in vivo model, and thus cannot be used as a decision criterion for drug screening. The currently available in vitro models such as 2D cultures, 3D cultures, organ on a chip can aid in understanding hearing loss only to an extent; the lack of cellular complexity and developmental stage, technical difficulties cannot replicate or replace in vivo models as of now. Future improvements in microfluidics and vascularized models can help mimic in vivo environment to a greater extent (Shah et al., 2024).*

*In the lab we have been working for the past 3 years to develop a cochlear organoid model from adult mouse cochlear tissue and human cochlear tissue. We worked on that project in the previous CCD license number AVD1150020186105 and it is one of the main projects in our recently approved license number AVD11500202417856. The organoid field for hair cell regeneration has only recently started and most researchers have focused on the neonatal cochlea, where they show great regeneration capacity. Unfortunately, for the adult mouse cochlea we observe a much more limited hair cell regeneration and we are currently trying to optimize the culture conditions to increase the yield of hair cells. For this project, the organoid model would not be suitable because it lacks the main cell type necessary to evaluate otoprotection, the hair cells, and we indeed need the complete organ of Corti to evaluate otoprotection in this model. We hope to further develop the cochlear organoid model so that it can replace animal experiments in the field of otoprotection in the future.*

*Finally, we have checked the following online tools [3Rs INFO HUB: Homepage](#), [NAT Database \(nat-database.org\)](#), and [Biomedical research \(europa.eu\)](#). The neural models are interesting, although not directly relevant for the current project which is on protection of the various cochlear cells (mainly hair cells) against ototoxic insults and treatment after cellular damage. When in the course of the proposed study in vitro/ex vivo models that are suitable become available we will consider to use them for our study.*

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om 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 onderzoekers hebben eerder veel ervaring opgedaan met een model waarbij kanamycine gebruikt wordt om doofheid bij

proefdieren te induceren, waardoor het mogelijk wordt de hierbij betrokken mechanismen (functieverlies van haarcellen) te bestuderen. Dit nieuwe onderzoek beoogt stoffen te onderzoeken die ototoxiciteit, geïnduceerd door geneesmiddelen, moet voorkomen of waar mogelijk genezen, door de functie van haarcellen te herstellen. Voor dit onderzoeksproject worden twee geneesmiddelen als modellen gebruikt, die beiden bekend staan om het induceren van gehoorverlies als ongewenste bijwerking bij een klinische toepassing, te weten kanamycine (een aminoglycoside antibioticum) en cisplatine (een cytostaticum). Hiervoor wordt een standaardmodel in (transgene) jongvolwassen muizen gebruikt. Men wil uiteindelijk tot een oplossing (preventie en/of therapie) komen voor gehoorschade die door het gebruik van deze geneesmiddelen bij mensen, vooral kinderen, kunnen optreden. In het onderzoek naar iatrogene schade (door geneesmiddelen of toxische stoffen veroorzaakte gehoorschade) is kanamycine een bekende modelstof, en uit klinisch onderzoek is eveneens de ototoxiciteit van cisplatine (vooral bij toepassing in de chemotherapie bij kinderen) als potentieel ototoxisch bekend.

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 doelcategorie, te weten fundamenteel onderzoek, sluit aan bij de hoofddoelstelling(en).

#### *Belangen en waarden*

4. Het directe doel van het project is in muizen na te gaan welke stoffen betrokken zijn door kanamycine en cisplatine geïnduceerde ototoxiciteit. Het uiteindelijke doel van het project is inzicht verkrijgen in de moleculaire mechanismen die bijdragen aan schade en verlies van cochleaire cellen na behandeling met ototoxische geneesmiddelen. In de toekomst zou dit onderzoek mogelijk kunnen bijdragen aan een oplossing voor de bescherming tegen gehoorschade door gebruik van ototoxische medicatie in de kliniek. De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel, en dat het doel gerechtvaardigd is in de context van het neuro-otologische onderzoeksveld en de behoefte vanuit de (kinder)geneeskunde.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: proefdieren, onderzoekers, subsidievertrekkers en toekomstige patiënten. De muizen hebben als proefdieren groot belang bij het gevrijwaard blijven van de experimenten. Voor de onderzoekers kan het van groot belang om aansprekende onderzoeksresultaten te behalen na hun jarenlange inzet op dit onderzoeksgebied, evenals voor subsidieverstrekkers ten aanzien van de financiering. Dit onderzoek kan mogelijk bijdragen aan meer kennis voor preventie of behandeling van gehoorverlies veroorzaakt door ototoxiciteit waardoor dit onderzoek voor deze patiëntengroep en de geneeskunde uiteindelijk van groot belang zou kunnen zijn.

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 ervaren onderzoeksgroep op o.a. het gebied van gehooronderzoek met muizen en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen. Experiment 1 is het *in vivo* valideren wat eerder *in vitro* is gedaan. Aan de hand daarvan kan men keuzes maken voor de vervolgexperimenten. Daarnaast wil men in de pilot nagaan of eenmalige toediening van furosemide voldoende is om gehoorschade te induceren in plaats van de standaard 3x toediening, waarbij meer ongerief voor de dieren zou ontstaan. Eenmalige toediening zou volgens de DEC daarom een verfijning zijn. Furosemide wordt in dit project intraveneus toegediend (en niet oraal) en heeft in dit geval een zeer korte halfwaardetijd van <30 min. Deze manier van toepassing is al eerder gebruikt en kan als gevalideerd model worden gezien. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen volgens de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

#### *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 volgens de DEC realistisch ingeschat en geclassificeerd. De ototoxische behandelingen om doofheid te induceren met kanamycine of een lage dosis cisplatine en de intracochleaire toediening van geselecteerde geneesmiddelen via

micro-injectie (onder algehele anesthesie) veroorzaken bij de muizen matig ongerief. In uitzonderlijke gevallen kan de procedure voor het induceren van ototoxiciteit leiden tot ernstig ongerief. De kans hierop wordt volgens de DEC zoveel mogelijk beperkt door het zorgvuldig toepassen van de humane eindpunten, maar ernstig ongerief is niet geheel uit te sluiten. Verder zullen de muizen licht ongerief ervaren door de maximaal 3x herhaalde registratie van Auditory Brainstem Responses (ABR) onder lichte anesthesie en de DEC vindt dit passend.

Het diureticum furosemide, dat wordt toegediend om het ototoxisch effect van cisplatinum te versterken, veroorzaakt zelf voornamelijk reversibele effecten. De onderzoeker heeft volgens de DEC voldoende toegelicht wat het belang van de furosemide-toediening is en de benodigde (hydratatie)zorg om ongerief te verminderen. Tevens is voldoende toegelicht waarom het doofheidsmodel nog valide is in vergelijking met de humane situatie waar geen furosemide wordt toegediend.

12. De integriteit van de dieren wordt met name fysiek aangetast door de ototoxische behandelingen om doofheid te induceren, de toediening van de geneesmiddelen via micro-injectie en de ABR registraties en tenslotte door de vroegtijdige dood.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren (<1%) dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Een humaan eindpunt kan met name bereikt worden door gewichtsverlies, dehydratatie of wondinfectie en zal gemonitord worden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De DEC heeft bediscussieerd of de mogelijkheden voor voorbereiden *in vitro/ex vivo* zoals celkweekresultaten, *ex vivo* explants en organoïdenkweken voldoende verkend zijn. Op deze manier zou in ieder geval een voorselectie van veelbelovende mogelijke antagonist of agonisten gemaakt kunnen worden, waarbij veelbelovende geneesmiddelen dan uiteindelijk *in vivo* in een diermodel getest zouden kunnen worden ter bevestiging van het therapeutische effect. Tot op heden is deze vervangende mogelijkheid nog niet toereikend en dit is voldoende toegelicht.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie met o.a. go/nogo's om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen.
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. Indien blijkt dat eenmalige toediening van furosemide voldoende is dan zou dit een verfijning betekenen ten opzichte van de gebruikelijke driemaal toediening.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

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

18. Dieren van beide geslachten zullen worden ingezet, waarbij aangepaste doses kanamycine voor mannelijke en vrouwelijke dieren gebruikt wordt zodat haarcelverlies en gehoorverlies in dezelfde mate geïnduceerd worden.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood om postmortem de cochlea's te kunnen verwijderen voor onderzoek. De dieren worden op een passende wijze, in overeenstemming met bijlage IV van de EU richtlijn, gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

*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 belang van dit onderzoek, namelijk nagaan welke stoffen betrokken zijn bij geneesmiddel geïnduceerde ototoxiciteit, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren rechtvaardigt.
2. Er vindt een aantasting van welzijn en integriteit van de in totaal 782 proefdieren plaats, met ernstig (maximaal 7 muizen), matig (665 muizen) en licht (110 muizen) ongerief. Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project ertoe bijdragen dat er meer bekend is over de moleculaire mechanismen die bijdragen aan schade en verlies van cochleaire cellen na behandeling met ototoxische geneesmiddelen bij muizen. Cisplatine is voor kinderen met kanker ototoxisch, maar in voorkomende gevallen onvermijdbaar. Daarom zou het heel zinvol zijn om met de behandeling direct een 'hulpmiddel' te kunnen geven met een beschermend effect voor de haarcellen in het oor. Het is aannemelijk dat de fundamentele doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat meer kennis over het voorkomen of behandelen van ototoxiciteit als bijwerking van een geneesmiddel een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Aangezien ernstig ongerief, ondanks de toepassing van humane eindpunten, niet geheel uit te sluiten is zal achteraf een reflectie op het project en het ongerief door middel van een Beoordeling Achteraf nodig zijn. De relatie tussen het directe en het uiteindelijk doel is voldoende helder. Het is aannemelijk dat de directe doelstelling behaald zal worden. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat er geen sprake zal zijn van onbedoelde negatieve effecten voor mens, dier en milieu als gevolg van de dierproeven. 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.

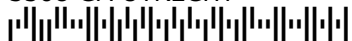


> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD11500202418278

**Bijlagen**

2

Datum 2 augustus 2024

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 augustus 2024. Het gaat om uw project "Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD11500202418278. 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), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

**Datum:**

2 augustus 2024

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202418278

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

**Bijlagen:**

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur



### Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3508 GA UTRECHT

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]  
Functie: KNO-arts  
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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 oktober 2024  
Geplande einddatum: 30 september 2029  
Titel project: Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss  
Titel niet-technische samenvatting: Bescherming van het gehoor en behandeling van gehoorverlies  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 1.617,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:   
Functie:   
Plaats: Utrecht  
Datum: 30 juli 2024



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**  
Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD11500202418278  
**Bijlagen**  
2

Datum 2 augustus 2024  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 2 augustus 2024  
Vervaldatum: 1 september 2024  
Factuurnummer: 2418278  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD11500202418278	€ 1.617,00

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 te 's Gravenhage.

**From:** [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
**To:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](#)  
**Cc:** [REDACTED] [DEC-Utrecht@umcutrecht.nl](mailto:DEC-Utrecht@umcutrecht.nl)  
**Subject:** Aanhouden AVD11500202418278  
**Date:** 18 September 2024 13:15:39

---

**CAUTION:** This email originated from outside of Utrecht University. Do not click links or open attachments unless you recognize the sender and know the content is safe.

Geachte [REDACTED]

Op 02-08-2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss" met aanvraagnummer AVD11500202418278. 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**

- U geeft aan stoffen toe te dienen in het slakkenhuis, kunt u toelichten wat dit is?
- Kunt u toelichten waarom het nodig is furosemide toe te dienen?
- Kunt u de NTS in excel format indienen?

### **Onduidelijkheden**

- U heeft in de NTS aangegeven dat het om translationeel en fundamenteel onderzoek gaat. In het projectvoorstel heeft u alleen fundamenteel onderzoek aangekruist. Kunt u de documenten met elkaar in overeenstemming brengen?
- Kunt u in de Bijlage dierproeven, onder F, een zin toevoegen met het percentage per ongeriefklasse samengevat voor de hele bijlage?

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 dit bericht op. U kunt dit aanleveren via NetFTP.

Uw aanvraag zal worden behandeld in de vergadering van 11 oktober. Antwoorden die voor deze datum worden ingediend zullen worden meegenomen in de bespreking van uw aanvraag.

### **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



[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

.....  
Postbus 93118 | 2509 AC | Den Haag

.....  
T: 0800 789 0789

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Dit bericht kan informatie bevatten die niet voor u is bestemd. Indien u niet de geadresseerde bent of dit bericht abusievelijk aan u is gezonden, wordt u verzocht dat aan de afzender te melden en het bericht te verwijderen.

De Staat aanvaardt geen aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die verband houdt met risico's verbonden aan het elektronisch verzenden van berichten.

This message may contain information that is not intended for you. If you are not the addressee or if this message was sent to you by mistake, you are requested to inform the sender and delete the message.

The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.

Aan: Centrale Commissie Dierproeven

Betreft: AVD11500202418278

1 oktober 2024

Geachte leden van de CCD,

Dank voor uw behandeling van onze aanvraag en uw vragen.

Punt voor punt volgen hier mijn antwoorden op uw vragen. Wijzigingen naar aanleiding van uw vragen zijn in NTS en Appendix weergegeven in rood.

*Niet technische samenvatting*

1) U geeft aan stoffen toe te dienen in het slakkenhuis, kunt u toelichten wat dit is?

Antwoord: De vraag gaat over punt 23 procedure c. Het slakkenhuis is het gehoororgaan waarin zich de haarcellen bevinden, die zorgen voor omzetting van geluidssignalen naar elektrische signalen die doorgegeven kunnen worden aan de hersenen. De haarcellen, maar niet het slakkenhuis, zijn eerder genoemd bij punt 18. We hebben bij punt 18 een zin toegevoegd om de term slakkenhuis te introduceren: "De haarcellen bevinden zich in het slakkenhuis, het gehoororgaan."

De stoffen worden gekozen op grond van de vetmoleculen (lipiden) die een rol spelen bij de beschadiging van de haarcellen door de ototoxische geneesmiddelen. Dit wordt beschreven in punt 18, laatste zin.

De toediening van de gekozen stoffen gebeurt eenmalig, één dag voordat de ototoxische geneesmiddelen worden toegediend. Dit wordt beschreven in punt 23, procedure c.

2) Kunt u toelichten waarom het nodig is furosemide toe te dienen?

Antwoord: De vraag gaat over punt 23 procedure b. Furosemide verlaagt de barrière van bloed naar slakkenhuis waardoor het ototoxische middel (cisplatine of kanamycine) makkelijker het slakkenhuis en vervolgens de haarcellen binnendringt met de beschadigende werking op de haarcellen. Hierdoor kan met een lagere dosis van het ototoxische middel worden voldaan om hetzelfde effect of de haarcellen te verkrijgen. A) Het aantal toedieningen is daardoor beperkt. B) Het systemische effect van het ototoxische

middel op andere organen is hierdoor beperkt (Li et al., Neurotox Res. 20:307-319, 2011). Beide voordelen verlagen het ongerief voor het proefdier.

De volgende zin is toegevoegd bij punt 23: "Furosemide wordt toegediend om het effect van kanamycine dan wel cisplatine te versterken, wat schade aan andere organen beperkt, en wat de benodigde dosis en het aantal toedieningen beperkt, en daarmee het ongerief beperkt."

3) Kunt u de NTS in Excel format indienen?

Antwoord: Ja. In het Word versie van NTS zijn wijzigingen in rood weergegeven. De Excel versie is een schone versie van NTS.

#### *Onduidelijkheden*

4) U heeft in de NTS aangegeven dat het om translationeel en fundamenteel onderzoek gaat. In het projectvoorstel heeft u alleen fundamenteel onderzoek aangekruist. Kunt u de documenten met elkaar in overeenstemming brengen?

Antwoord: Dit was een discussiepunt met de DEC: fundamenteel en translationeel, of alleen fundamenteel. Het zit er wat tussenin. We hebben gekozen voor alleen fundamenteel. Het verzicht met dit fundamentele onderzoek is gericht op de patiënt, maar het translationele aspect komt niet direct aan de orde. Het is nu aangepast in het NTS naar alleen fundamenteel.

5) Kunt u in de Bijlage dierproeven, onder F, een zin toevoegen met het percentage per ongeriefsklasse samengevat voor de hele bijlage?

Antwoord: We hebben de volgende zin toegevoegd aan F: "In summary, the numbers and percentages per category discomfort are mild: 110 (14.1%), moderate: 665 (85.0%) and severe: 7 (0.9%)."

Vriendelijke groeten,

[Redacted]

Afdeling Keel-, Neus- en Oorheelkunde  
UMC Utrecht

[Redacted]



> Retouradres Postbus 93118 2509 AC Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3508 GA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl  
0800 789 0789  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD11500202418278

**Bijlagen**

3

Datum 14 oktober 2024

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 augustus 2024 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss" met aanvraagnummer AVD11500202418278. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed. Uit artikel 10a, eerste lid van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet) volgt daarom dat het is toegestaan om uw project uit te voeren binnen de gestelde vergunningsperiode. Deze vergunning wordt afgegeven voor de periode van 14 oktober 2024 tot en met 30 september 2029.

Aan de vergunning hebben wij de volgende voorwaarde verbonden op grond van artikel 10a1, tweede lid van de wet.

### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

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

## **Procedure**

**Datum:**

14 oktober 2024

**Aanvraagnummer:**

AVD11500202418278

### *Advies dierexperimentencommissie*

Wij hebben advies gevraagd bij de dierexperimentencommissie DEC Utrecht (hierna: DEC). Dit advies is ontvangen op 17 september 2024. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, derde lid van de wet.

### *Nadere vragen aanvrager*

Op 18 september 2024 hebben wij u om aanvullingen gevraagd. U heeft tijdig antwoord gegeven. Het verzoek om aanvullingen had betrekking op de doelcategorie, het ongerief en enkele teksten in de niet-technische samenvatting. Uw reactie is betrokken bij de behandeling van uw aanvraag.

## **Overwegingen**

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

### *Beoordeling achteraf*

Na afloop van het project moet er een beoordeling plaatsvinden zoals bedoeld in artikel 10a1, eerste lid, onder d en artikel 10a1, derde lid van de wet. De reden van deze beoordeling achteraf is dat in dit project dieren ernstig ongerief ondergaan. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2030 plaatsvinden. Meer informatie over de eisen die gesteld worden bij de beoordeling achteraf vindt u in de bijlage 'Weergave wet- en regelgeving'.

## **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 93118, 2509 AC 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. Nadat u een bezwaarschrift heeft ingediend kunt u een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank in de vestigingsplaats van de vergunninghouder. U moet dan wel kunnen aantonen dat er sprake is van een spoedeisende situatie.

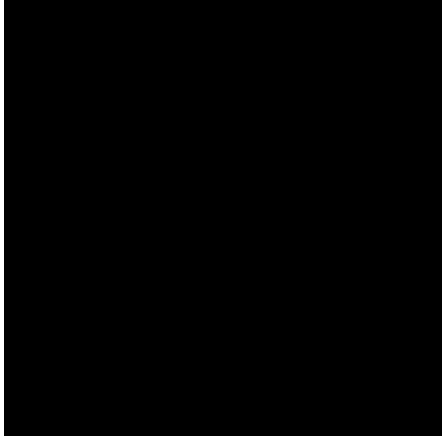
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de vergunninghouder valt.

**Datum:**  
14 oktober 2024  
**Aanvraagnummer:**  
AVD11500202418278

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), stuur een e-mail naar [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl) of neem telefonisch contact met ons op: 0800 789 0789.

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Bijlagen:

- Projectvergunning
- 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: 3508 GA UTRECHT  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 oktober 2024 tot en met 30 september 2029, voor het project "Protection of hearing against trauma and treatment of sensorineural hearing loss" met aanvraagnummer AVD11500202418278, na advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Wetenschappelijk onderzoeker. Voor de uitvoering van het project en voor de overeenstemming ervan met de verleende projectvergunning is KNO-arts verantwoordelijk. Het besluit is gebaseerd op de volgende (aangepaste) stukken:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, zoals ontvangen op 2 augustus 2024
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen op 2 oktober 2024;
  - b Bijlagen dierproeven
    - 3.4.3.1. The role of bioactive lipid signaling (endocannabinoids and specialized pro-resolving lipid mediators) in sensorineural hearing loss, zoals ontvangen op 2 oktober 2024;
  - c Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen op 2 oktober 2024;
  - d Advies van dierexperimentencommissie, zoals ontvangen op 17 september 2024
  - e De aanvullingen op uw aanvraag, zoals ontvangen op 2 oktober 2024.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ongerief
<b>3.4.3.1. The role of bioactive lipid signaling (endocannabinoids and specialized pro-resolving lipid mediators) in sensorineural hearing loss</b>			
	Muizen (Mus musculus)	782	0,9% Ernstig 85,0% Matig 14,1% Licht

### Voorwaarden

#### *Beoordeling achteraf*

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet. Daarom bent u verplicht om na afloop van de vergunning in een Beoordeling achteraf over uw project te rapporteren. Deze beoordeling zal uiterlijk september 2030 plaatsvinden. Er zal dan conform artikel 10a2, derde lid van de wet, beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt.

**Aanvraagnummer:** AVD11500202418278

**Geldende voorschriften**

Wij wijzen u op onderstaande geldende voorschriften, die volgen uit artikel 1d, vierde lid, artikel 10, eerste lid en/of artikel 10a3 van de wet.

- 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:**

AVD11500202418278

## 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, derde lid van de wet. Uit artikel 10b, eerste lid van de wet 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, eerste lid van de wet de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven. Artikel 10b, tweede en derde lid van de wet schrijven 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 van de wet 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

**Aanvraagnummer:**  
AVD11500202418278

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

### **Einde van een dierproef**

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

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

### **Beoordeling achteraf**

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