



Aanvraagnummer AVD-104002015109

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

**1 Gegevens aanvrager**

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  Ja > Vul uw deelnemernummer in 10400  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam instelling of organisatie	Wageningen University
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
KvK-nummer	9215846
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
Postbus	59
Postcode en plaats	6700AW Wageningen
IBAN	NL10 RABO 0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	@wur.nl

1.4 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
Functie	[Redacted]	
Afdeling	[Redacted]	
Telefoonnummer	[Redacted]	
E-mailadres	[Redacted]	@wur.nl

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 6 - 2015 |
| Einddatum  | 1 - 6 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Metabole gezondheid: van geïntegreerd testmodel tot identificatie van gezondheidsbevorderende (voedings-)stoffen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-WU                           |
| Postadres   | Postbus 9191, 6700 HB Wageningen |
| E-mailadres | [redacted]@wur.nl                |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel + beschrijving dierproeven
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- ~~rekeningverklaring~~ Bestelorder
- advies DEC-WU

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[REDACTED]
Functie	gemandateerd vergunninghouder
Plaats	Wageningen
Datum	6 - 5 - 2015
Handtekening	[REDACTED]



2

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University

Postbus 59  
6700 AW Wageningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD104002015109

**Uw referentie**

**Bijlagen**

Datum 08-06-2015

Betreft Leges Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 07 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients' met aanvraagnummer AVD104002015109. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt.

**Wanneer een beslissing**

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

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post





## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University

Postbus 59  
6700 AW Wageningen

**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD104002015109

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 10 Juni 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 07 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients' met aanvraagnummer AVD104002015109. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet), conform de aangevraagde periode van 10 juni 2015 tot en met 01 juni 2020. Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project 'Metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients' starten.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-WU gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons om onderstaande redenen niet volledig vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Om de haalbaarheid van fase twee te kunnen beoordelen is aanvullende informatie nodig over de wijze waarop de doseringen van de te testen (voedings)stoffen bepaald gaan worden. Daarnaast is de CCD van mening dat u nog dient vast te stellen hoe gehandeld gaat worden indien dieren onverwacht negatieve bijwerkingen ontwikkelen na toediening van de te testen (voedings)stoffen. Om deze redenen hebben wij extra voorwaarden verbonden aan deze vergunning.

### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

**Datum**  
10 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD104002015109

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

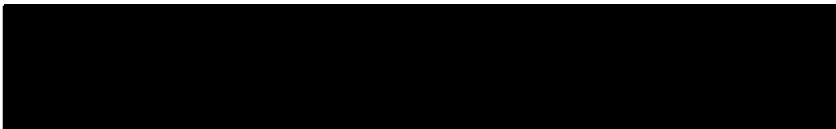
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef         |
|------------|------------------------|
| 3.4.4.1    | metabolic health mouse |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Within this experiment two phases are discriminated. In phase 1, a positive control compound will be tested to validate the integrative in vivo test model. In phase 2, compound and nutrients will be studied to assess their modulatory effect on metabolic health using the model validated in phase 1. In phase 1, adult mice will receive a high-fat diet for 15 weeks, since this has shown to induce significant weight gain and accompanied impaired metabolic health [REDACTED]. After acclimatisation, animals will be weighed and stratified based on their body weight. During the fattening period (15 weeks after acclimatisation) animals will be weighed weekly to follow their gain in body weight to minimize variation among groups. During the intervention period (the 18 days after the fattening period), animals will receive a positive control compound or control placebo via oral gavage to validate the

integrative test method. After a short period (between days 2-7) and a longer period (between days 12-18) after the start of the intervention whole body energy expenditure, metabolic flexibility, and total activity will be determined using the indirect calorimetry system (performed 2x, duration 4-5 days per run). An oral glucose tolerance test will be performed on 5hr-fasted mice in the second week after the start of this intervention (once between day 8 and 12). Blood will be sampled (3x 20 µl in 30 minutes) to measure glucose and insulin. Body weight and body composition will be measured before the start of the intervention and before and after the indirect calorimetry measurements using [REDACTED]. At the end of the experiment blood and tissues will be harvested, snap frozen and stored at -80°C.

In phase 2, multiple compounds and nutrients will be tested using the same set-up as described above with only minor adaptations for evaluation of nutrient-induced effects. For both compounds and nutrients always a control (no compound/nutrient) as well as a low and a high dose will be included. Nutrients will be provided directly after acclimatisation (i.e. also during the 15 weeks fattening period) and will be included in the diet (or no addition in case of control). A second adaptation is that whole body energy expenditure and metabolic flexibility will be measured only once (at the end of the study).

Inclusion of multiple doses contributes to added value for data interpretation and ultimate predictions for optimal metabolic health improvements induced by the compound/nutrient. The exact non-toxic dose given to the Low and High group will be determined per compound/nutrient during the project based on available prescreening data (in vitro) and/or published data. We aim to study beneficial effects of compound/nutrient interventions, therefore the dose will not cause any additional severity. It is common to select two doses with a dose ratio of factor 5-10. In all situations, dose selection will be discussed with the IvD.

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

After arrival, the mice will receive a standard diet for 2 weeks to acclimate to their new environment. Next, the animals will receive a high-fat diet for 15 weeks. On this diet the animals will become obese and will develop a metabolic profile that links to metabolic disease. This approach will provide a relevant diet-induced model with a health condition that is susceptible for health improvements induced by compounds or nutrients that are subject of this proposal. After this run-in period the short test period will start (the actual experiment). The short duration of the integrative test phase (primarily using non-invasive methods) is the key of this experiment. It reduces the amount of compound/nutrient needed and benefits animal welfare (i.e. principally non-invasive measurements are used and the period with maximal discomfort (moderate) is as short as possible with maximal effectiveness in terms of effect). We discriminate two types of set-up in this animal experiment, namely a set-up for compounds and for nutrients. For compound studies, animals will first be fattened for 15 weeks, after which the animals will receive the intervention (carrier or carrier + compound) for 18 days. The compound will be provided daily via oral gavage at the start of the dark period (when the mice become active). This resembles most closely the expected ultimate exposure of the compounds, which is oral bolus use. For nutrient studies, animals will receive the nutrient in their diet, which resembles the ultimate exposure of the nutrients. This diet (+ nutrient) will be provided directly after acclimatisation for 15 weeks. This duration is based on established effects on metabolic condition.

For both set-ups, body weight and body composition [REDACTED] will be measured and will be used for stratification of the mice into experimental groups (n=12/group). One group will be sacrificed just before the start of the intervention. This group will serve as basal group. Whole body energy expenditure, metabolic flexibility, and total activity will be determined using the indirect calorimetry system. These measures using the indirect calorimetry system are the primary measures of this proposal. The mice will remain in their home cage with bedding for this assessment, which lasts 5 days. For the metabolic flexibility assessment, the mice will be fasted during inactive light phase and re-fed during the following active darkphase. The metabolic response to refeeding will be assessed. [REDACTED]

[REDACTED] As we are able to measure 12 mice at the same time in the indirect calorimetry system, we will adjust the experimental logistics accordingly. For compound studies, the whole body energy expenditure and metabolic flexibility will be determined twice (duration: first time 5 days, second time 4 days). Measurements in the first week will give insight into immediate responses of the compound intervention, while measurements in the third week

are essential to show later responses. For nutrient studies, responses are mostly expected in the later stage, and therefore we will measure whole body energy expenditure and metabolic flexibility only once at the end of the study.

Between day 8-12, an oral glucose tolerance test will be performed once on 5hr-fasted mice. Blood will be sampled (3x 20 µl in 30 minutes) to measure glucose and insulin. These are essential measures in the evaluation of metabolic state. When the set-up is validated, in a later stage, we aim to omit the oral glucose tolerance test and insulin measurement whenever scientific acceptable (so that only non-invasive measures remain). To measure the animal response to the indirect calorimetry measurements we will assess body weight and body composition before and after this measurement. At the end of the experiment (compounds: 15 weeks fattening+18 days compound; nutrients: 15 weeks) blood and tissues will be harvested, snap frozen and stored at -80°C, which will be used for detailed molecular studies.

---

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

Regarding the number of animals per group, we will use as few as possible, but as many as needed. Power calculation on our previous data shows that 12 mice per group are needed to obtain sufficient power to assess fasting-refeeding metabolic flexibility differences (measured using indirect calorimetry) induced by a nutritional intervention. Importantly, one of our aims is based on obtaining linked and paired data (phase 1) in one integrative in vivo model. This approach contributes to sufficient power of our test model, and is therefore expected to sensitively detect effects in subsequent phase 2 studies. Since sex differences have shown to significantly affect whole body metabolism and physiology, and therefore also the response to intervention strategies (■■■■) ■■■■ we will only include mice of one sex/group in our studies. This reduces the variation in our data and thus prevents the need of using additional animals. In phase 1 we aim to validate the sensitivity of our approach for studying metabolic health. The sensitivity of our approach is sex independent. In phase 1, we will use ■■■■ with proven effect on metabolic health in males. Therefore only males will be used phase 1. In phase 2, modulatory effects of compounds/nutrients will be studied. As explained, this can differ between sexes. For that reason it is essential to test effects of compounds and nutrients on both sexes.

Regarding the number of groups needed, we aim to reduce the number of groups as much as possible. For this, we decided to include only one reference group, namely animals without compound/nutrient, but with placebo intervention. These animals are on a high-fat diet similar as the intervention groups. On purpose we will not include a healthy reference group (animals on a low-fat diet) as second reference group, since this extra comparison option will not benefit answering the specific aim of our study. Moreover, if possible, we will combine testing compounds/nutrients so that reference groups can be shared. Together, using this approach we will limit the number of groups in this experiment as much as possible, thus limiting the number of animals needed.

---

## **B. De dieren**

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

In our proposal we discriminate the following groups:

Basal group: animals are sacrificed as intervention starts (compounds: after fattening; nutrients: after acclimatisation). These animals are essential for basal values that are essential to proof that our approach (in which the animals receive a high-fat diet) lead to development of the metabolic syndrome. Moreover, this group is needed to proof whether the intervention leads to the hypothesized improved metabolic health or that the control group developed a lowered health state.

Control group: animals that receive 0 mg/kg of compound/nutrient (negative control) and run parallel to our intervention groups (Low and High groups). These animals are essential to determine compound/nutrient-mediated effect on studied parameters.

Low group: Animals that receive the low effective concentration of the selected compound/nutrient.

High group: Animals that receive the high effective concentration of the selected compound/nutrient.

For Control/Low/High groups: Section is at the end of the compound/nutrient intervention period, and all measures will be identical in Control/Low/High groups.

Adult C57BL/6J mice will be used (4-5 weeks old at arrival) which will be ordered from [REDACTED], a registered animal breeding and delivery laboratory in the Netherlands. We have selected this strain because these mice are sensitive to diet-induced weight gain and insulin resistance when exposed to a western high-fat diet [REDACTED]. Furthermore, the data of this experiment can be compared to available in-house data of our lab, as these data is also from the C57BL/6J strain.

Our critical parameter is metabolic flexibility (measured using indirect calorimetry), which will be measured in the Control, Low and High group. The exact values used for the calculation below are based on data derived from a study in which biological significance of the intervention was demonstrated, therefore the values used in the power calculations have a solid biological value. . The calculation showed that in studies in which effects of dietary interventions on metabolic flexibility at least 12 animals per group are needed to obtain sufficient power (tested one-sided). This was calculated with Java Applet for Power and Sample Size, Lenth R.V., (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/power>) using SD1 (SD control group)=252 ml O2/6h, SD2 (SD intervention group)=350 ml O2/6h, True difference of means = 367 ml O2/6h power=0.8.

We also checked for effects on blood glucose levels in that study (to be measured in Control, Low, and High groups; SD1=0.90 mg/dL, SD2=1.2 mg/dL, True difference of means=1.2 mg/dL, Power=0.8) for which 13 animals are needed according to the calculation. However, another in-house I data set showed that using 12 animals statistical differences with p-value<0.01 were detected. If we take this latter finding along in our evaluation on optimal animal number per group, we believe that, if the intervention affects blood glucose levels, also with n=12 (instead of the calculated n=13) this can be demonstrated.

Since we also will perform molecular analyses (to be measured in all groups (Basal, Control, Low, High)), including gene expression profiling, we checked the number of animals that are needed for such analyses. Multiple studies [REDACTED] have shown that for identification of differences the use of 12 animals are optimal. In the publication of [REDACTED] we describe detailed calculations on basis of group sizes and identification of significantly regulated genes ([REDACTED] using a data set of 12 animals). The key conclusion of this calculation was that the accepted minimum group size for identification of significant differences on gene expression level is 12 animals/group.

In conclusion, we found that 12 animals per group are essential in the present study in all groups in order to draw reliable conclusions from our data.

Within this animal experiment we plan to validate our integrated design and if successful to evaluate 10 compounds/nutrients for their modulatory effects on metabolic health. With a minimum of n=12 per group and 3 concentrations (0 (control), low, high) per compound/nutrient + basal group, we will maximally need 1056 animals (phase 1: 96 animals (2 compounds (positive control and back-up strategy) at 2 concentrations of n=12; 2x12=24 + control group of n=12 + basal group of n=12) and phase 2: 960 animals (per sexe:10 compounds/nutrients of 2 concentrations of n=12; 10x2x12=240), + 10x control group of n=12 + 10 x basal group/experiment n=12).

For phase 1 (model validation), only males will be used. For phase 2 (effects of compounds/nutrients), both males and females will be used (in separate groups).

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

In this proposed study, we aim to evaluate improvement of metabolic health, which is predominantly of interest for human metabolic health. Also, we aim to unravel molecular modulation of compound- and nutrient-induced improvement of metabolic health. For this, analyses in various tissues (including multiple skeletal muscle tissues, liver tissue) are essential. Since sampling of these tissues is not possible in humans (for instance using biopsies), we will use animals in this study. As mice and humans are 99% genetically similar (Gunthar and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with disease, mice are widely accepted to be used as experimental model to study human disease. The C57BL/6J mice are recognized to have an eating behaviour similar to humans, i.e. overeating on high-fat diet. Therefore, these animals are a good model for research on studies that aim to investigate metabolic health improvement.

Because we aim to investigate the effects of compound or nutrient intervention on whole body metabolism and no alternative for such complex integrative processes and organ-organ interactions are available, it is not possible to use an in vitro system.

Based on statistical calculations and phased execution of this animal experiment, animal use will be reduced as much as possible. Moreover, shared use of data from basal and control groups via combination of phase 2 compound/nutrient studies will further reduce the number of experimental animals. Such combination allows the use of only one basal group and one control group per experimental period, which substantially reduce the number of animals. We aim to combine 2-3 compound/nutrient experiments per studies (6 experiments in phase 2 within this proposal), which may reduce the number of animals by 144 animals (from 1056 to 912).

Our high expertise on studies in mice ensures that we are competent in designing animal studies that require the least amount of animals with the least amount of severity. As such, we have chosen mostly non-invasive but sensitive measures to answer our research questions. The methods [REDACTED] and indirect calorimetry are both non-invasive and provide a wealth of data on respectively body composition and whole body energy metabolism. Because these measurements are non-invasive we are able to perform these measurements at several time points within the same animal throughout the study. This limits variation and subsequently increases the power to detect significant differences between our experimental groups because of paired data, leading to reduction of animal numbers.

In order to study beneficial effects of compound/nutrient intervention and subsequent analyses for optimal dose selection for metabolic health improvement multiple doses are essential (Slob et al., 2002). Via careful dosing selection based on state-of-the-art data (in house pre-screening data and/or scientific publications) we expect that using only two doses per compound/nutrient (i.e. low and high dose; factor 5-10 difference) is suitable. The use of only two dose groups contributes to an important reduction of the animal number in the present study.



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

We have selected sensitive mostly non-invasive measurements that will not cause pain to the animals. Importantly, we analyse beneficial health effects by compounds/nutrients, no toxicological effects. Moreover, in our indirect calorimetry system the animals will remain in their own homecage which minimizes stress. Animals will be checked daily by an experienced person to assess their health condition. Based on our animal experimental set-up we do not expect any extreme discomfort (maximal severity is moderate). In any unexpected situation that an animal suffers it will be sacrificed. Humane endpoints will be determined in individual protocols in consultation with the IvD.

Environment: No substantial negative effects for the environment are expected.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

- A literature search in Pubmed (search term: "Metabolic Diseases"[Mesh] AND "Mice"[Mesh] AND "Metabolism"[Mesh] combined with 'indirect calorimetry', intervention, nutrient, or health improvement) did not reveal publications that investigated the use of an integrative protocol to assess improvement of metabolic health.

Discussions within our international network and at conference meetings provide additional support that our proposed research has not been performed earlier.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

- Mice will be group-housed (according to EU regulation) as long as this will not interfere with the study set-up. Mice will be individually housed as soon as the interventions starts (Compounds: group housing during acclimatisation and 15 weeks fattening, individual housing during 18 days intervention. Nutrients: group housing during acclimatisation, individual housing during 15 weeks fattening + intervention), because it is essential to monitor individual food intake during the experiment, which is not possible if animals are grouped-housed. The mice will get cage enrichment and bedding throughout the study and at libitum food and water (except for short fastening during indirect calorimetry).

Animals will be fasted at day 4 of the indirect calorimetry measurement to ensure similar start values of energy metabolism of the animals. However, this fasting will be performed during the inactive phase of the animals (light phase) when mice normally do not eat. Therefore this adaptation is not expected to intervene with animal well-being.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

The only action that may cause pain is the oral glucose tolerance test. Use of anaesthesia affects blood glucose homeostasis and levels, which is one of the key parameters in this study.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Summary of discomfort: During this proposed study the following discomfort is expected: individual housing, oral gavage, weighing, [REDACTED], indirect calorimetry, fasting, oral glucose tolerance test (3x 20 µl in 30 minutes).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Discomfort is caused by experimental approach as described in A. No additional discomfort expected.

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

We aim to minimize the discomfort as much as possible by the following actions: animals will arrive at a young age (4-5 weeks) since this is expected to prevent fighting after stratification, and thus will allow group housing during the fattening period in compound-based studies. Animals can stay in their homecage during the indirect calorimetry measurement, which will prevent stress. Animals will be fasted during daytime (light period), during this time span mice normally don't eat, which minimizes potential discomfort. We will combine measures as much as possible, to prevent that animals are disturbed more than needed. For example, at days when weighing and [REDACTED] is scheduled we will do this in one run.

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

The discomfort of the individual assessments is classified as follows:

Individual housing (compounds: during intervention period (18 days); nutrients: during combined fattening + intervention period (15 weeks): moderate

Oral gavage (only by compound studies, daily during a period of 18 days): minor

Weighing: minor

██████████: minor

Indirect calorimetry in home cage: minor

Fasting: minor

Oral glucose tolerance test (OGTT)(20 µl, 3x in 30 minutes): minor

We do not expect additional discomfort from the dietary intervention. Our experimental high-fat diet reflects both the human energy% and saturated versus unsaturated fatty acid composition. Also, when we evaluate effects of compounds or nutrients these are selected because of their suggested beneficial effects on metabolic health.

During the acclimatisation period there is no handling that causes severity to the mice. During the fattening period the cumulative severity is minor when compound-effects are studied and moderate when nutrient-effects are studied (because of individual housing). During the intervention period the cumulative severity is moderate (both compound and nutrient studies). Collectively, the cumulative severity of the interventions is considered moderate.

OF NOTE: Animals in the basal groups will be sacrificed before the start of the intervention. These animals will only experience severity from determination of body weight and body composition. The total severity of basal groups is therefore minor.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

To evaluate intervention-induced regulation of molecular processes on tissue level, tissues need to be dissected after the intervention. These tissues will be used for detailed molecular analyses, such as gene and protein expression profiling and mitochondrial activity measurements.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

More than half of the Dutch population in the age group 30-70 years is too heavy (BMI over 25), and 13% is obese (BMI over 30). Obesity is a known risk factor for the metabolic syndrome, which is defined as central obesity plus 2 of the following factors: hypertension, low HDL-cholesterol, elevated glucose level and/or elevated triglyceride level. In the Netherlands, according to this definition, 34% of men and 24% of women suffer from the metabolic syndrome (Blokstra et al., 2012). Worldwide the prevalence of metabolic syndrome varies greatly mostly depending on socio-demographics with percentages ranging from 10-50%. People diagnosed as metabolic syndrome patients have an increased the risk of developing more severe disease like type 2 diabetes and cardiovascular diseases.

Exercise or caloric restriction would be a good approach to improve metabolic health. Unfortunately, this approach appears to be mostly unsuccessful on the long-term as relapse rates are high. This is evidenced by the increasing prevalence of people that suffer from obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes and cardiovascular diseases. As a consequence more people undergo bariatric surgery as an ultimate rescue, with 175.000 surgeries in 2013 in the US alone. Even after such intense surgery, the relapse is high, about one third experience a relapse within 5 years of initial remission (Arterburn, Obes Surg, 2013). Fundamental research has identified several proteins that function as central hubs in the regulation of energy metabolism. These findings make such proteins attractive therapeutic targets in the treatment of the metabolic syndrome and metabolic diseases like type 2 diabetes. Importantly, for some of these targets it has indeed been shown that these can be modulated by compounds or nutrients (compounds are defined as chemical substances, and nutrients are defined as substances present in our diet). However, in most cases effects on metabolic health have not yet been proven, but claims are predominantly based on theory or in vitro studies. In our ongoing research, we regularly identify compounds or nutrients that are able to modulate such targets (leads), and thereby are hypothesized to prevent metabolic-health decline.

Testing of compounds or nutrients that target metabolic syndrome and metabolic diseases is done in distinct steps. An essential step in this cascade is an in vivo assessment in a model organism to show effectiveness in targeting a disease. Standard measures in this type of studies include determination of adiposity, insulin sensitivity, and metabolic rate. Also the use of indirect calorimetry is a proven accurate method to investigate energy expenditure. More recently, we have shown added value of testing metabolic flexibility, induced by a fasting-refeeding challenge, using the indirect calorimetry system, as sensitive measure for metabolic health [REDACTED]. So far, however, no protocol has been described that successfully and sensitively measures these above-mentioned parameters in one integrative (metabolic flexibility using indirect calorimetry, oral glucose tolerance test, [REDACTED] molecular responses on tissue level) and short assessment. In applied research, there is a need for a sensitive model that can be used to study the hypothesized beneficial effects of compounds and nutrients. Moreover, such studies will contribute to fundamental knowledge about detailed mode of action and molecular regulation of physiological processes. The combination of both applied and fundamental aims of this research will benefit the project via the following loop: improved fundamental insight might improve identification of new targets and leads for further applied research, which will lead to more fundamental and applied knowledge.

#### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

#### AIM

The key aim of this research is: to study the effectiveness of lead compounds/nutrients in targeting metabolic diseases, using a validated integrative physiological relevant in vivo model.

The present proposal consists of two phases, which are both primarily in the field of applied knowledge. Each phase aims to answer a specific research question.

#### Phase 1:

- Is our proposed integrative in vivo model successful in sensitive identification of the selected positive control that is known to target metabolic diseases? (applied)

#### Phase 2:

- Can selected compounds/nutrients positively modulate metabolic health as measured using our new-developed integrative in vivo model? (applied)
- Which molecular processes that relate to metabolic health are modulated by selected compounds/nutrients? (fundamental)

#### FEASIBILITY

The expertise required for this research (indirect calorimetry, oral glucose tolerance test, [REDACTED]; details in appendix) is state-of-the-art, operational and available at our facility. The present proposal will benefit from our significant experience in performing in vivo experimentation, which has resulted in a proven well-structured coordination of studies with laboratory animals.

The present proposal consists of two phases. In the first phase, we will validate our integrative in vivo model that is designed to identify compounds that target metabolic diseases. For this, we selected a positive compound [REDACTED] that is known to positively modulate metabolic health. [REDACTED] was identified as selectively activating ligand for [REDACTED] in in vitro studies. [REDACTED] is a transcription factor that regulates expression of almost half of all mitochondrial-encoded proteins, controls mitochondrial biogenesis and controls oxidative metabolism. Its activation would be beneficial since mitochondrial function is impaired in metabolic syndrome (i.e. lowered mitochondrial content and defective oxidative metabolism). Indeed, in vivo studies showed that oral administration of [REDACTED] improved the metabolic response on both a physiological level (via improved glucose handling, normalization of insulin and triglyceride levels, and prevention of high-fat-diet-induced weight gain), as well as on molecular level (by altered expression of [REDACTED], including altered gene expression profiles of fatty acid metabolism and mitochondrial functioning in liver tissue) [REDACTED]. These positive effects of [REDACTED] via specific activation of ERR $\alpha$ , a known target in metabolic health, makes [REDACTED] a suitable positive control in the present study.

In the second phase, we will test lead compounds/nutrients in our integrative model to study its modulatory effects on metabolic health. Lead selection will be as follows: compounds will be selected based on detailed knowledge from pre-screening studies (including structural, computational, pharmacokinetic studies), nutrients will be selected based on scientific support for target activation at relevant doses.

#### 3.3 Belang

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

The scientific value of this proposed research is that detailed fundamental insight will be obtained by studying compound/nutrient-induced molecular regulation of metabolic-related processes. We will characterize these molecular effects in multiple target tissues including liver and muscle tissues in order to improve our understanding of mechanistic regulation of compound/nutrient-induced improvement of metabolic health. Also, an integrated in vivo test system, which we aim to validate in phase 1, increases the quality of information from our proposed as well as future studies, because paired data of multiple endpoint measures can be obtained. Next, confirmation of our hypothesis that the selected compounds or nutrients can modulate metabolic processes at the molecular level and thereby target metabolic disease (phase 2) is essential for further lead optimization, toxicity evaluation, and preclinical evaluation. The social relevance of this proposal is that our proposed integrative testing strategy (phase 1) aims to shorten the duration of the animal experiment, while at the same time it will increase the number of measures (paired data), which is a significant improvement from an ethical point of view. The subsequent phases, in which the modulatory effect of compounds/nutrients on metabolic health will be evaluated, contribute to identification of compounds/nutrients that target metabolic health. These compounds/nutrients can ultimately be used in the treatment or prevention of metabolic diseases.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

In order to answer the main aim of the present proposal, we will first (phase 1) evaluate if our proposed integrative in vivo model is successful in sensitive identification of beneficial health effects as induced by the positive compound. Based on the outcome of phase 1 a go/no go evaluation is planned. If the model tested in phase 1 provides valid and sensitive outcomes, we will continue with phase 2 (go).

In any unexpected situation that our positive control does not show improvement of metabolic health in phase 1, we will follow the following strategy: if the positive compound was not successful for a plausible reason, we will repeat phase 1 with another positive compound. If this positive compound is also not successful in modulating metabolic health measures, we will not continue to phase 2 (no go).

In phase 2, we will use the integrative model to study modulation of compounds/nutrients on metabolic health. In general, this involves two doses of the test substance (Low and High group). The exact (non-toxic) doses of the Low and High group will be determined during the project based on available prescreening data (in vitro) and/or published data. We aim to study beneficial effects of compound/nutrient interventions, therefore the dose will not cause any additional severity. It is common to select two doses with a dose ratio of factor 5-10. In all situations, dose selection will be discussed with the IVD.

In all studies, we will include a basal group (sacrificed before intervention), and a control group. The control group consists of animals that receive no compound/nutrient and run parallel to our intervention groups (Low and High groups). These animals are essential to determine compound/nutrient-mediated effects on studied parameters.

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

Within this proposal two phases are discriminated that both aim to study metabolic health. Phase 1 comprises metabolic health model development, in phase 2 we focus on modulation of metabolic health by compounds/nutrients using the model as developed in phase 1. Because these two phases both focus on evaluation of metabolic health, one type of animal experiment will be used.

The proposed study will be performed in a mice model of diet-induced obesity of which, besides non-invasive measures and blood sampling during the study, muscle, adipose, and liver tissues will be harvested at the end of the intervention. As mice and humans are 99% genetically similar (Ghunter and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with disease, mice are widely accepted to be an experimental model to study human metabolic disease. In addition, C57BL/6J mice are recognized to have an eating behaviour similar to humans, i.e. overeating on a high-fat diet. The analysis in various tissues to study molecular regulation of metabolic health cannot be realized in humans (biopsies of liver, muscle etc. are not feasible).

Furthermore, the results of this experiment can be used for comparison to the other animal experiments carried out in our group as these also used the C57BL/6J strain.



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

---

The experiments that we propose are closely linked since we will use the integrative in vivo model that we validate in phase 1 for testing the effects of compounds/nutrients in phase 2. Using the data obtained from our phase 1 experiment we will be able to answer our first research question whether our proposed integrative in vivo model is successful in sensitive identification beneficial health effects as induced by the positive compound. Before we will start the experiments of phase 2, a go/no go decision is incorporated. We will only continue the experiments of phase 2 if our conclusion of the phase 1 experiment is positive.

Multiple experiments will be performed in phase 2; these experiments have a similar set-up with the main difference being the compound/nutrient that is used for the intervention. For the first phase 2 experiments, we have selected 1 compound and 2 nutrients to study, which are both leads for modulation of metabolic health based on our available data. Based on our ongoing research we will select additional compounds/nutrients (max. 10 total) to test their modulation on metabolic health in our integrative in vivo model.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Metabolic health mouse
2	
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** maandag 15 juni 2015 17:11  
**Aan:** [redacted]@wur.nl'  
**Onderwerp:** Terugkoppeling aanvraag projectvergunning (AVD104002015109)

Geachte mevrouw [redacted]

Op 07 mei 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project project 'Metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients' met aanvraagnummer AVD104002015109.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Langs deze weg willen wij u graag informeren over de door de CCD gestelde voorwaarden aan de projectvergunning. Er zijn geen aanvullende vragen aan de aanvrager gesteld.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

- 1) De aanvrager dient voor aanvang van fase 2 nader te specificeren op welke wijze de lage en hoge doseringen van de te testen (voedings)stoffen bepaald zullen worden en te beschrijven welke criteria zullen worden toegepast om deze doseringen vast te stellen. Deze informatie is noodzakelijk om de haalbaarheid van fase 2 van het project te kunnen beoordelen. Deze onderbouwing en specificatie dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van de aanvullende informatie beoordelen of fase 2 van de dierproef al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. De aanvrager mag pas met fase 2 starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.
- 2) De aanvrager dient voor aanvang van fase 2 van het project, in overleg met de IvD, vast te stellen hoe gehandeld gaat worden indien dieren onverwacht negatieve bijwerkingen ontwikkelen na toediening van de te testen (voedings)stoffen. Deze voorwaarde is toegevoegd om onnodig lijden van dieren te voorkomen.

Tot slot willen wij u graag bedanken voor uw heldere advies.

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

Met vriendelijke groet,

[redacted]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)  
 .....  
 Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
 .....  
 T: 0900 2800028  
 E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)



## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Wageningen University  
Adres: Postbus 59  
Postcode en woonplaats: 6700 AW Wageningen  
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 10 juni 2015 tot en met 01 juni 2020, voor het project 'Metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients' met aanvraagnummer AVD104002015109, gebaseerd op het advies van Dierexperimentencommissie DEC-WU.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 07 mei 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 07 mei 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 07 mei 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 04 mei 2015, zoals ontvangen bij digitale indiening op 07 mei 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Metabolic health mouse Fase 1	Muis -C57BL/6J	96/ 5 jaar	25% gering 75% matig	-n.v.t.
Fase 2	Muis -C57BL/6J	960/ 5 jaar	25% gering 75% matig	-Specificatie van de wijze van bepaling van de dosering van de (voedings)stoffen dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. -Handelswijze bij onverwachte bijwerkingen dient i.o.m. de IvD te worden vastgesteld.

#### Extra voorwaarden:

1) De aanvrager dient voor aanvang van fase 2 nader te specificeren op welke wijze de lage en hoge doseringen van de te testen (voedings)stoffen bepaald zullen worden en te beschrijven welke criteria zullen worden toegepast om deze doseringen vast te stellen. Deze informatie is noodzakelijk om de haalbaarheid van fase 2 van het project te kunnen beoordelen. Deze onderbouwing en specificatie dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van de aanvullende informatie beoordelen of fase 2 van de dierproef al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. U mag pas met fase 2 starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.

2) De aanvrager dient voor aanvang van fase 2 van het project, in overleg met de IvD, vast te stellen hoe gehandeld gaat worden indien dieren onverwacht negatieve bijwerkingen ontwikkelen na toediening van de te testen (voedings)stoffen. Deze voorwaarde is toegevoegd om onnodig lijden van dieren te voorkomen.

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt.

Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

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

Uit artikel 13c 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 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.

# DEC-advies

---

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD-104002015109
2. Titel van het project: 'Metabole gezondheid: van geïntegreerd testmodel tot identificatie van gezondheidsbevorderende (voedings-)stoffen'.
3. Titel van de NTS: Metabole gezondheid: van geïntegreerd testmodel tot identificatie van gezondheidsbevorderende (voedings-)stoffen'.
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam: DEC Wageningen Universiteit
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED] [wur.nl](http://wur.nl)
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 13-04-2015
  - aanvraag compleet: ja
  - in vergadering besproken: 20-04-2015
  - termijnonderbrekingen van 21-04-2015 tot 04-05-2015
  - aanpassing aanvraag: 04-05-2015
  - advies aan CCD: 04-05-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum 21-04-2015
  - Strekking van de vragen:
    - Bij 3.1 (Achtergrond) en in de NTS een duidelijkere omschrijving van de definiëring/ afbakening van het probleem, de context ervan en de reikwijdte van het onderzoek, waarbij wordt ingegaan op de bijdrage die het onderzoek levert aan medicijnontwikkeling; Tevens ingaan op de plaats die het onderzoek inneemt in de totale keten van het probleem van obesitas en daaraan gerelateerde ziekten in relatie met andere behandelings- en interventiemogelijkheden (bijv. preventieve maatregelen).
    - Bij 3.4. (Onderzoeksstrategie) duidelijker uitleg over het werkingsmechanisme van de te onderzoeken stof;
    - In de bijlage bij A. (Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters) een toelichting op de keuze voor mannelijke/ vrouwelijke dieren;
    - Bij B. (De dieren) een uitgebreidere toelichting bij de statistische onder-

bouwing en argumentatie van de noodzaak van een van de proefgroepen;

- Redactionele/ tekstuele opmerkingen;

- Advies om de NTS laten bekijken door een communicatiedeskundige aangezien deze erg compact was geschreven, nog een aantal type- en taalfouten en jargon en vaag taalgebruik bevatte.

- Datum antwoord: 22-04-2015

- Strekking van het antwoord:

Op basis van bovenstaande vragen is de projectaanvraag door de aanvrager aangepast. In de huidige versie is voldoende tegemoet gekomen aan de vragen van de DEC.

9. 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. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

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

1. Het project is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als reëel belang. Obesitas is een substantieel maatschappelijk probleem en metabool syndroom is een erkende ziekte, het onderzoek richt zich echter op een deel van een lange keten van handelingsmogelijkheden, nl. op het snel screenen van stoffen met gebruikmaking van een model, waar betrekkelijk weinig dieren voor nodig zijn. Hiermee wordt ingestoken op reparatie van obesitas-gerelateerde gezondheidsproblemen en niet op preventie van obesitas. Hoewel de DEC onderkent, dat preventie minstens zo belangrijk is, is zij van mening, dat reparatie een belangrijke bijdrage kan leveren aan de humane gezondheid. Derhalve oordeelt de DEC dat aan dit project een reëel belang moet worden toegekend.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Naar de overtuiging van



de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De betrokken onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven methodieken en onderzoeksvelden. Er worden ter validering van een testmodel stoffen gekozen, waarvan de werkzaamheid al is aangetoond. Na validering van dit testmodel zullen hiermee stoffen worden onderzocht op hun effect op metabole gezondheid, die worden geselecteerd op basis van gedetailleerde kennis uit prescreeningstudies of basis van wetenschappelijke aanwijzingen.

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De dieren gedurende een deel van het experiment anders dan conform bijlage III van de Richtlijn gehuisvest. Ze zullen individueel worden gehuisvest zodra de interventie begint (gedurende 18 dagen of 15 weken). De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Met het oog op een beter mechanistisch inzicht in de werkzaamheid van (voedings)stoffen en het ontwikkelen van interventiestrategieën is een diermodel nodig. Om interventiegeïnduceerde regulering van moleculaire processen op weefselniveau te evalueren, moeten weefsels worden ontleed na de interventie. Deze weefsels worden gebruikt voor een gedetailleerde moleculaire analyse, zoals gen- en eiwitexpressieprofielen en mitochondriale activiteit. Dit kan niet in de mens worden gerealiseerd (biopoten van lever, spieren enz. zijn niet haalbaar).
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De gekozen aantallen zijn minimaal nodig om de benodigde analyses te kunnen uitvoeren. Door fasering, statistische onderbouwing, het gebruik van één sekse en inteeltmuizen wordt het aantal dieren geminimaliseerd. In de loop van het project zal de IvD voorgenomen experimenten moeten beoordelen op de vraag, of er mogelijkheden zijn voor verdere vermindering door het combineren van te testen stoffen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

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

## **D. Ethische afweging**

De DEC is unaniem van mening dat het doel van het project het gebruik van de dieren en het ongerief dat deze proefdieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan enerzijds een bijdrage leveren aan het ontwikkelen van een gevoelige en nauwkeurige meetmethode voor het bestuderen van metabole gezondheid in muizen en aan het verkrijgen van inzicht in het werkingsmechanisme van (voedings-)stoffen. Anderzijds kan het een verkorte en verbeterde strategie opleveren voor het bestuderen van metabole gezondheidsverbetering door (voedings-)stoffen en aan de identificatie van (voedings-)stoffen die bijdragen aan verbeterde metabole gezondheid. Voor dit project zijn geen alternatieven beschikbaar. De uitvoering is niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

## **E. Advies**

Advies aan de CCD:

De DEC adviseert unaniem de vergunning te verlenen.



## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Wageningen University  
Adres: [REDACTED]  
Postcode en woonplaats: [REDACTED]  
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 10 juni 2015 tot en met 01 juni 2020, voor het project 'Metabolic health: from integrated test model to identification of health improvement by compounds and nutrients' met aanvraagnummer AVD104002015109, gebaseerd op het advies van Dierexperimentencommissie DEC-WU.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 07 mei 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 07 mei 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 07 mei 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 04 mei 2015, zoals ontvangen bij digitale indiening op 07 mei 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Metabolic health mouse Fase 1	Muis -C57BL/6J	96/ 5 jaar	25% gering 75% matig	-n.v.t.
Fase 2	Muis -C57BL/6J	960/ 5 jaar	25% gering 75% matig	-Specificatie van de wijze van bepaling van de dosering van de (voedings)stoffen dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. -Handelswijze bij onverwachte bijwerkingen dient i.o.m. de IvD te worden vastgesteld.

### Extra voorwaarden:

1) De aanvrager dient voor aanvang van fase 2 nader te specificeren op welke wijze de lage en hoge doseringen van de te testen (voedings)stoffen bepaald zullen worden en te beschrijven welke criteria zullen worden toegepast om deze doseringen vast te stellen. Deze informatie is noodzakelijk om de haalbaarheid van fase 2 van het project te kunnen beoordelen. Deze onderbouwing en specificatie dient ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van de aanvullende informatie beoordelen of fase 2 van de dierproef al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. U mag pas met fase 2 starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.

2) De aanvrager dient voor aanvang van fase 2 van het project, in overleg met de IvD, vast te stellen hoe gehandeld gaat worden indien dieren onverwacht negatieve bijwerkingen ontwikkelen na toediening van de te testen (voedings)stoffen. Deze voorwaarde is toegevoegd om onnodig lijden van dieren te voorkomen.

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt.

Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdoving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

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

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

Uit artikel 13c 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 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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59

6708 WG WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD104002015109

**Bijlagen**

2

Datum 08-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 april 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD104002015109. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur





Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Postdoctoral researcher  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]@wur.nl

**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 juni 2015  
Geplande einddatum: 1 juni 2020  
Titel project: metabolic health from intgrated test model to identification of health improvement by compounds and nutriens  
Titel niet-technische samenvatting: Metabole gezondheid: van geïntegreerd testmodel tot identificatie van gezondheidsbevorderende ( voedings-) stoffen  
Naam DEC: DEC-WU  
Postadres DEC: Postbus 9191, 6700 HB Wageningen  
E-mailadres DEC: [REDACTED]@wur.nl


**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:   
Functie: gemandateerd vergunninghouder  
Plaats: Wageningen  
Datum: 6 mei 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59

6708 WG WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD104002015109

**Bijlagen**

2

Datum 08-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 8 mei 2015

Vervaldatum: 7 juni 2015

Factuurnummer: 201570109

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD104002015109	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



## 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 in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  Ja > Vul uw deelnemernummer in 22300  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*
- 1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.  
 Naam instelling of organisatie VisAdvies  
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]  
 KvK-nummer [Redacted]
- 1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*  
 Straat en huisnummer Veluwehaven 43  
 Postbus postbus 2744  
 Postcode en plaats 3433PW Nieuwegein  
 IBAN NL98ABNA0400119528  
 Tenaamstelling van het rekeningnummer [Redacted]
- 1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted]  Dhr.  Mw.  
 Functie [Redacted]  
 Afdeling [Redacted]  
 Telefoonnummer [Redacted]  
 E-mailadres [Redacted]@visadvies.nl
- 1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  
 (Titel) Naam en voorletters [Redacted]  Dhr.  Mw.  
 Functie [Redacted]  
 Afdeling [Redacted]  
 Telefoonnummer [Redacted]  
 E-mailadres [Redacted]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 - 0 6 - 2 0 1 5
- Einddatum 0 1 - 0 6 - 2 0 2 0
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Vissen zwemmen heen en weer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Vissen zwemmen heen en weer
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC ASG-Lelystad
- Postadres ██████████ 5
- E-mailadres ████████████████████

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam



Functie

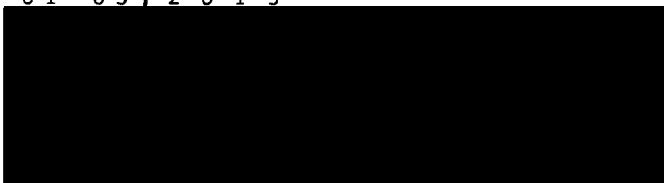
Plaats

Nieuwegein

Datum

01 - 05 2015

Handtekening



[Redacted]

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** dinsdag 16 juni 2015 15:16  
**Aan:** [Redacted]@wur.nl'  
**Onderwerp:** Beschikking AVD2015110 ter kennisgeving

Geachte DEC ,

Op 4 mei 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project getiteld: "Vissen zwemmen heen en weer". De CCD heeft besloten de vergunning overeenkomstig uw advies te verlenen. Er is geen aanvullende informatie of correspondentie met de aanvrager geweest. Wij willen u hartelijk danken voor uw advies,

Met vriendelijke groet, [Redacted]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VisAdvies

Postbus 2744  
3433PW Nieuwegein  
Nederland

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD223002015110

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 02 juni 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 4 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Vissen zwemmen heen en weer" met aanvraagnummer AVD223002015110. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Vissen zwemmen heen en weer" starten.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC-DLO gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

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

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

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

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

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



**Datum**  
12 mei 2015

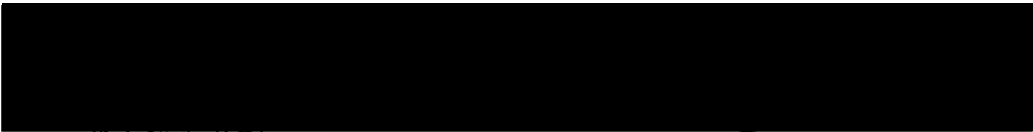
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015101

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. Ger de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: VisAdvies  
Adres: Veluwehaven 43  
Postcode en woonplaats: 3433PW Nieuwegein  
Deelnemersnummer: 22300

deze projectvergunning voor het tijdvak 02 juni 2015 tot 01 juni 2020, voor het project "Vissen zwemmen heen en weer" met aanvraagnummer AVD223002015110, gebaseerd op het advies van Dierexperimentencommissie DEC-DLO.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Directeur. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 4 mei 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 4 mei 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 4 mei 2015.
  - c. Advies van dierexperimentencommissie zoals behandeld in de vergadering van 24 april, ontvangen op 4 mei 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst	Voorwaarden
Telemetrisch onderzoek	vis	3000 / 5 jaar	matig	3x n= 200 in grote rivieren
				6x n=400 in kleine systemen
Merk en terugvangst	vis	1000/ 5 jaar	matig	

### Dit project en wijzigingen

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### Verzorging

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en

gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen. In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdooving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving 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 verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn kunnen lijden als de verdooving eenmaal is uitgewerkt, moeten preventief en postoperatief behandeld worden met pijnstillers of andere geschikte pijnbestrijdingsmethoden, mits die verenigbaar zijn met het doel van de dierproef. Zodra het doel van de dierproef is bereikt, moeten passende maatregelen worden genomen om het lijden van het dier tot een minimum te beperken.

### **Einde van een dierproef**

Artikel 13a van de wet bepaalt dat een dierproef is afgelopen wanneer voor die dierproef geen verdere waarnemingen hoeven te worden verricht of, voor wat betreft nieuwe genetisch gemodificeerde dierenlijnen, wanneer bij de nakomelingen niet evenveel of meer, pijn, lijden, angst, of blijvende schade wordt waargenomen of verwacht dan bij het inbrengen van een naald. Er wordt dan door een dierenarts of een andere ter zake deskundige beslist of het dier in leven zal worden gehouden. Een dier wordt gedood als aannemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand. Volgens artikel 13b moet de dood als eindpunt van een dierproef zoveel mogelijk worden vermeden en vervangen door in een vroege fase vaststelbare, humane eindpunten. Als de dood als eindpunt onvermijdelijk is, moeten er zo weinig mogelijk dieren sterven en het lijden zo veel mogelijk beperkt blijven.

Uit artikel 13c 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 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.



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	223000				
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	VisAdvies				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Telemetrisch onderzoek</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Telemetrisch onderzoek
Volgnummer	Type dierproef					
1	Telemetrisch onderzoek					

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Met telemetrisch onderzoek worden vissen individueel gevolgd binnen een onderzoeksgebied. Dit gebied is voorzien van detectiestations die passerende vissen registreren. Aanvullend kan informatie worden verkregen door het inzetten van mobiele detectiestations. De uitkomst is een set detecties met van elke detectie de datum, tijd, locatie en het unieke nummer. Hiermee kunnen vragen over het migratiegedrag van vissoorten worden beantwoord

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

De vissen worden voorzien van een zender of een tag die in de buikholte wordt aangebracht. Op basis van de vissoort en het onderzoeksgebied, wordt een keuze gemaakt voor een tag of zender. Het verschil zit voornamelijk in de wijze waarop het signaal wordt overgebracht. Een zender bevat een batterij waardoor er actief een signaal kan worden afgegeven. Een tag bevat geen batterij en is daarmee volledig afhankelijk van een antenne voor de overdracht van gegevens.

De vissen worden bij voorkeur gevangen in het onderzoeksgebied. In het geval een soort niet of slechts in beperkte mate in het onderzoeksgebied voorkomt, worden de proefdieren speciaal gekweekt, zoals bijvoorbeeld het geval is met jonge zalmen.

Na de vangst of het transport worden de vissen kortstondig in gevangenschap gehouden in een leefnet of een bassin met vers doorstromend water. Vervolgens worden ze één voor één worden gemerkt. De proefdieren worden hierbij eerst in het stadium van chirurgische verdoving gebracht door toepassing van een oplossing van benzocaïne. Dit middel is bruikbaar voor alle vissoorten. Gedurende het proces van verdoven wordt vastgesteld of de vis geschikt is om te worden gemerkt (algehele conditie, gewichtscriterium; de vis wordt gemeten en gewogen). Indien dit niet het geval is wordt de vis niet gemerkt en samen met andere vissen uitgezet.

De wijze waarop de zender of tag wordt ingebracht is afhankelijk van het type zender of tag. Er wordt hierbij gebruik gemaakt van twee methoden:

#### 1. via een incisie

Bij het gebruik van een zender wordt deze via een incisie in de buikholte geplaatst.

Voor het inbrengen van de zender wordt gebruik gemaakt van het operatieprotocol (Vriese, 1995). De proefdieren worden na verdoving ondersteboven in een goot gelegd, waarbij de kieuwen van de vis worden doorstroomd met water voorzien van benzocaïne oplossing. Onder semi-steriele omstandigheden (steriele doeken, handschoenen en operatiemateriaal) wordt vervolgens een incisie van 1-2 cm langs de linea alba gemaakt tussen borst- en anaalvin, er voor zorg dragend dat de inwendige organen niet worden beschadigd.

Na een inwendige controle wordt vervolgens de steriele zender in de buikholte aangebracht. De incisie wordt daarna gesloten met 2-3 hechtingen (Ethicon Vicryl, snijdende naald 3/0).

#### 2. met behulp van een injectiepistool

Voor het implanteren van de PIT tags wordt gebruik gemaakt van een injectiepistool in combinatie met injectienaalden.

Semi-steriel werkend (steriele doeken, handschoenen en operatiemateriaal) wordt met behulp van een injectiepistool en holle injectienaald een tag in de buikholte ingebracht. Hierbij wordt de vis met de buik omhoog gehouden en wordt de tag tussen borst- en anaalvin ingebracht. Om te zorgen dat de inwendige organen niet worden beschadigd, wordt het tagpistool onder een hoek van 10 tot 20 graden gehouden. De incisie die door de naald wordt aangebracht is dusdanig klein dat een hechting overbodig is. Op basis van een Deens onderzoek waarbij verschillende tagmethoden werden onderzocht is geconcludeerd dat, de methode waarbij geen hechting wordt gebruikt de meeste geschikte is (Skov et.al, 2005). Na het inbrengen van een PIT tags bij voornachtigen (117-163 mm) zijn de vissen in een laboratorium geobserveerd. Na 37 dagen bleek de tag-retentie 100%.

Nadat de tag of zender is ingebracht en een eventuele incisie is gesloten, wordt de vis bijgebracht in een bassin die wordt voorzien van vers doorstromend water. De vis wordt hierbij voortdurend geobserveerd. Wanneer de vis goed in staat is te zwemmen en zijn normale gedrag weer vertoont, wordt deze vervolgens teruggezet in het onderzoeksgebied. Indien de vissen niet op de uitzetlocatie worden gemerkt, worden ze tijdelijk terug gezet in de bassins.



Wanneer de vissen voldoende zijn herstelt, worden ze vervoerd naar de uitzetlocatie. Dit kunnen meerdere locaties zijn omdat bijvoorbeeld de migratieknelpunten in meerdere riviertakken worden onderzocht. Tijdens deze opslagperiode worden de vissen dagelijks geobserveerd en gevoerd. Tijdens het transport worden de vissen opgeslagen in een ruim bassin en voorzien van de juiste zuurstofconcentratie.

Van alle vissen worden de voor het onderzoek belangrijke kenmerken (vangstdatum, vangstlocatie, totaallengte, gewicht, unieke nummer van de zender of tag, uitzetdatum, uitzetlocatielocatie en eventuele bijzonderheden) door het onderzoeksteam geregistreerd.

De aard van het onderzoek (het volgen van het natuurlijke gedrag van de vis) brengt met zich mee dat de proefdieren aan het eind van de proef in leven blijven. Zij zwemmen immers rond in hun natuurlijke omgeving.

#### Referenties:

Skov, C., J. Brodersen, C. Brönmark, L.-A. Hansson, P. Hertonsso, P. A. Nilsson, 2005. Evaluation of PIT-tagging in cyprinids. *Journal of Fish Biology* (Impact Factor: 1.83). 10/2005; 67(5):1195 - 1201. DOI:10.1111/j.1095-8649.2005.00814.

Vriese F.T., 1995. Implantering van transponders in salmoniden. Report no. 26, Organisation for the Improvement of Inland Fisheries, Nieuwegein.

---

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

Het aantal proefdieren is bepaald op basis van de ervaring uit eerdere onderzoeken. Omdat het onderzoek plaatsvindt in een ongecontroleerde omgeving is de invloed predatie, natuurlijke sterfte niet duidelijk meetbaar. Tevens kan een deel van de gemerkte vissen in het geheel geen migratiegedrag vertonen. De invloed van deze factoren is sterk afhankelijk van de soort en het onderzoeksgebied. Daarom is ervoor gekozen om het aantal proefdieren te baseren op resultaten van eerder uitgevoerde onderzoeken. Er bestaan immers geen statistische modellen waarin genoemde locatie specifieke factoren zijn verwerkt. Op basis van reeds uitgevoerd onderzoek kan bijvoorbeeld wel een goede inschatting worden gemaakt van bijvoorbeeld de predatie en natuurlijke uitval. In onderzoeken naar het migratiegedrag van een enkele vissoort worden over het algemeen 200 proefdieren ingezet. Indien het migratiegedrag van meerdere soorten binnen een stroomgebied op de lange termijn wordt onderzocht kunnen wel 200 tot 1600 proefdieren nodig zijn. Deze worden mogelijk uitgezet op verschillende momenten en locaties. Voor elke soort en uitzetlocatie dienen voldoende gegevens te worden verzameld om de betrouwbaarheid van de resultaten te borgen.

De afgelopen jaren is veel onderzoek uitgevoerd om migratieroutes van met name schieraal en salmoniden in de grote rivieren inzichtelijk te maken. We verwachten dat de komende jaren dit onderzoek in mindere mate zal worden uitgevoerd. In de grote rivieren zal de focus meer gaan liggen op het wegnemen van migratieknelpunten en de herintroductie van nieuwe soorten zoals bijvoorbeeld de Atlantische steur.

Daarentegen neemt de vraag naar onderzoek in kleinere systemen (beken, polders, etc.) juist toe. Nu de belangrijkste migratieknelpunten zijn opgelost kunnen telemetrieonderzoeken inzicht geven in de werking van een serie van vispassages. In dergelijke systemen wordt met name gebruik gemaakt van PIT telemetrie.

De verwachting is dat er in de komende vijf jaar in de grote rivieren drie onderzoeken worden uitgevoerd met elk gemiddeld 200 proefdieren. In kleinere systemen wordt verwacht dat er zes onderzoeken worden uitgevoerd met elk gemiddeld 400 vissen.

In totaal betekent dit een totaal aantal van 3000 proefdieren.

Op basis van de doelstelling, vissoort en onderzoeksgebied wordt het benodigde aantal te merken vissen vastgesteld. Hierbij wordt ook gekeken naar vergelijkbare onderzoeken met dezelfde vissoort. Deze keuzes worden afgestemd met de IvD.

---

### **B. De dieren**

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

In de periode 2015-2020 worden naar schatting 3000 vissen voorzien van een zender of tag. Dit kunnen alle soorten zijn die in de Nederlandse wateren voorkomen. In de grote rivieren zal de focus met name liggen op soorten als de steur, schieraal, zalm, zeeforel, en zeeprík. In kleinere systemen is het onderzoek meer gericht op (schier)aal, winde, snoek, riviergrondel, rivierdonderpad en rivierprík.

Deze soorten zijn voor veel waterbeheerder belangrijke (doel)soorten die indicatief zijn voor de toestand van het systeem. In de meeste gevallen gaat het om adulte dieren omdat zij naar verwachting meer gemotiveerd zijn om te migreren.

De dieren worden gevangen in het onderzoeksgebied of worden indien zij niet beschikbaar zijn in het onderzoeksgebied betrokken bij een kwekerij. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn bij de herintroductie van een soort zoals de steur of de zalm. Deze soorten worden speciaal gekweekt voor herintroductie en het uitvoeren van migratieonderzoek.

---

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

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

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

Telemetrieonderzoek wordt ingezet om inzicht te krijgen in het individuele migratiegedrag van vissen. Er zijn geen alternatieven om dit uit te voeren, zonder dat er sprake is van een dierproef. Omdat er specifiek gekeken wordt naar het individuele migratiegedrag van vissen in een polder-, beek- en riviersystemen is het noodzakelijk deze te voorzien van een merk.

Indien er geen noodzaak is om vissen individueel te volgen, maakt VisAdvies gebruik van een techniek waarbij migrerende vissen kunnen worden geregistreerd met een FishCounter. Met behulp van onderwaterbeelden kan de vis op soort worden gebracht. Dit biedt een goed alternatief voor telemetrisch

onderzoek, waarmee vervanging van een dierproef wordt gerealiseerd.

Het aantal proefdieren wordt bepaald op basis van een afweging tussen de verwachte resultaten en het benodigde aantal waarnemingen. Dit is sterk afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Indien een vissoort sterk gemotiveerd is om te migreren (bijvoorbeeld een schieraal) is het aantal benodigde proefdieren lager dan bij een soort waarvan verwacht wordt dat zij minder migratiegedrag vertonen. Gezien deze onzekerheden en het feit dat het onderzoek in een ongecontroleerde omgeving wordt uitgevoerd, bestaan er geen modellen of statistische methoden om het aantal proefdieren te bepalen. Wel kan de keuze worden gemaakt om het merken van de proefdieren in fasen uit te voeren. In dat geval kunnen de resultaten van de eerste batch worden gebruikt voor het bepalen van het aantal proefdieren voor de nieuwe batches. Dit is echter niet in alle onderzoeken mogelijk omdat de periode waarin de vissen moeten worden gemerkt te klein kan zijn om deze strategie toe te passen.

De keuze voor de telemetrie methode is afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Er wordt gebruik gemaakt van zo klein mogelijke tags. De minimale afmetingen (lengte en gewicht) van de proefdieren wordt vooraf bepaald op basis de afmeting van van de zender of tag. Door Lacroix et al.(2004) wordt aangegeven dat de lengte van de zender niet meer dan 16% van de lichaamslengte mag bedragen en het gewicht niet meer dan 8%. De tijd tussen het vangen en merken van de proefdieren wordt zo kort mogelijk gehouden door contact te onderhouden met de persoon die verantwoordelijk is voor het op locatie vangen van de proefdieren. Op die manier kunnen de proefdieren vrijwel direct naar de vangst worden gemerkt en uitgezet. Een keuze voor een lagere diersoort is niet mogelijk omdat specifiek wordt gekeken naar het migratiegedrag van bepaalde vissoorten.

Referentie:

Lacroix, G.L., D. Knox & P. McCurdy, 2004. Effects of implanted dummy acoustic transmitters on juvenile Atlantic salmon smolts. J. Trans. Am. Fish. Soc. 133: 211-220.

---

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

De periode tussen vangen en merken wordt bij voorkeur zo kort mogelijk gehouden om stress en angst te beperken. In de meeste gevallen worden de vissen binnen enkele uren gemerkt en uitgezet. Voorafgaand aan het inbrengen van het merk worden de proefdieren in het stadium van chirurgische verdoving gebracht. Na de ingreep worden de dieren zo snel mogelijk uitgezet in hun natuurlijke omgeving om stress en angst te beperken. Op basis van experimenten met het inbrengen van zendertjes en tags is de kans op sterfte zeer beperkt. Belangrijk hierin is dat het formaat van de zender of tag wordt afgezet tegen het formaat van de vis. Hiervoor worden standaard richtlijnen toegepast.

De handelingen worden uitgevoerd door vakbekwaam en gekwalificeerd personeel.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

De wens voor een telemetrisch onderzoek komt vaak voort uit een kennislacune. Door de verantwoordelijk onderzoeker wordt gekeken in hoeverre er



gegevens beschikbaar zijn uit de literatuur. Omdat het onderzoek zich meestal in een specifiek onderzoeksgebied wordt uitgevoerd, is er in veel gevallen bekend wat er in het verleden is uitgevoerd.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Van huisvesting is geen sprake omdat de proefdieren kort na de vangst worden gemerkt en weer worden uitgezet in hun natuurlijke omgeving.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

gevangenschap

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Om de proefdieren te kunnen merken worden ze eerst gevangen. Dit kan met passieve en actieve vistuigen gebeuren. De tijd tussen vangst en uitzetten kan voor de vis als angstig worden ervaren omdat deze in gevangenschap wordt gehouden.

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

De tijd tussen vangst en uitzetting wordt zo kort mogelijk gehouden. Passieve vangstopstellingen worden afgedekt om de kans op stress en predatie te voorkomen.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

Matig ongerief is te verwachten op grond van de implantatie (onder anesthesie) van zenders of tags in de buikholte. Het vangen, in opslag houden en eventueel transport zal ook ongerief veroorzaken.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef                                   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Merk en terugvangst"/> |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Merk- terugvangst experimenten geven inzicht in de migratie, verspreiding, conditie en groei van de proefdieren. De methode kan ook een waardevolle aanvulling vormen op telemetrisch onderzoek. Door gebruik te maken van een uitwendig merk met een unieke code en meldnummer kan informatie van terugvangsten worden verzameld. De kans op terugmeldingen wordt sterk vergroot door voldoende ruchtbaarheid aan het onderzoek te geven. Met name bij visuitzettingen of herintroductie van een soort is het belangrijk om de groeiontwikkeling, migratie, verspreiding en bedreigingen (bijvoorbeeld visserij) inzichtelijk te maken.

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

De vissen worden bij voorkeur gevangen in het onderzoeksgebied. In het geval een soort niet of slechts beperkt in het onderzoeksgebied voorkomt worden de proefdieren speciaal gekweekt, zoals bijvoorbeeld het geval is met steuren of spiegelkarpers.

De vissen worden kortstondig in gevangenschap gehouden in een leefnet of een bassin met vers doorstromend water, tot het moment waarop de vissen één voor één worden gemerkt. De vissen worden hierbij eerst in het stadium van chirurgische verdoving gebracht door toepassing van een oplossing van benzocaïne. Dit middel is bruikbaar voor alle vissoorten. Gedurende het proces van verdoven wordt vastgesteld of de vis geschikt is om te worden gemerkt (algehele conditie, gewichtscriterium; de vis wordt gemeten en gewogen). Indien dit niet het geval is wordt de vis niet gemerkt en samen met de andere vissen uitgezet.

De tag wordt met behulp van een holle naald aangebracht in de linkerflank van de vis, ter hoogte van de derde en vierde vinstraal van de rugvin. Hierbij wordt de naald onder een hoek van 45° gehouden. Het uiteinde van de tag wordt net achter de pterygiophore aangebracht. Nadat de tag is aangebracht wordt de vis bijgebracht in een bassin die wordt voorzien van vers doorstromend water. De vis wordt hierbij voortdurend geobserveerd. Wanneer de vis in staat is om zelfstandig te zwemmen en zijn normale gedrag weer vertoont, wordt deze vervolgens teruggezet in het onderzoeksgebied. Indien de vissen niet op de uitzetlocatie worden gemerkt, worden ze tijdelijk terug gezet in de bassins. Wanneer de vissen voldoende zijn herstelt, worden ze vervoerd naar de uitzetlocatie. Dit kunnen meerdere locaties zijn omdat bijvoorbeeld de migratieknelpunten in meerdere riviertakken worden onderzocht. Tijdens deze opslagperiode worden de vissen dagelijks geobserveerd en gevoerd. Tijdens het transport worden de vissen opgeslagen in een ruim bassin en voorzien van de juiste zuurstofconcentratie.

Van alle vissen worden de voor het onderzoek belangrijke kenmerken (vangstdatum, vangstlocatie, totaallengte, gewicht, unieke nummer van de tag, uitzetdatum, uitzetlocatielocatie en eventuele bijzonderheden) door het onderzoeksteam geregistreerd.

De aard van het onderzoek (het volgen van het natuurlijke gedrag van de vis) brengt met zich mee dat de proefdieren aan het eind van de proef in leven blijven. Zij zwemmen immers rond in hun natuurlijke omgeving.

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

Het aantal proefdieren is bepaald op basis van de ervaring uit eerdere onderzoeken. Omdat het onderzoek plaatsvindt in een ongecontroleerde omgeving is de invloed van predatie en natuurlijke sterfte niet duidelijk meetbaar. Ook is de kans op een terugmelding soms lastig te schatten. De invloed van deze factoren is sterk afhankelijk van de soort en het onderzoeksgebied. daarom is er voor om het aantal proefdieren te baseren op resultaten van eerder uitgevoerde onderzoeken. Er bestaan immers geen statistische modellen waarin genoemde locatie specifieke factoren zijn verwerkt. Op basis van reeds uitgevoerd onderzoek kan bijvoorbeeld wel een goede inschatting worden gemaakt van bijvoorbeeld de predatie en natuurlijke uitval.

In onderzoeken naar een enkele vissoort worden over het algemeen 200 tot 1200 proefdieren ingezet. Deze worden mogelijk uitgezet op verschillende momenten en locaties. Voor elke groep dienen voldoende gegevens te worden verzameld om de betrouwbaarheid van de resultaten te borgen.

Bij het uitzetten van vissen zoals spiegelkarper wordt steeds meer aandacht besteed aan het bepalen van het resultaat. Waterbeheerders willen meer inzicht in de overleving en verspreiding van de uitgezette vissen. We zien dit type onderzoek dan ook de komende jaren verder uitbreiden.

De verwachting is dat de komende vijf jaar er vier onderzoeken worden uitgevoerd met elk gemiddeld 200 proefdieren. In totaal betekent dit een totaal aantal van 1000 proefdieren.

Op basis van de doelstelling, vissoort en onderzoeksgebied wordt het benodigde aantal te merken vissen vastgesteld. Hierbij wordt ook gekeken naar vergelijkbare onderzoeken met dezelfde vissoort. Deze keuzes worden afgestemd met de IvD.

## **B. De dieren**

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

In de periode 2015-2020 worden naar schatting 1000 vissen voorzien van een uitwendige tag. Dit kunnen alle soorten zijn die in de Nederlandse wateren voorkomen. De focus zal met name liggen op soorten als de steur, paling, spiegelkarper en zalm.

Deze soorten zijn voor veel waterbeheerder belangrijke (doel)soorten die indicatief zijn voor de toestand van het systeem. Anderzijds is bijvoorbeeld de spiegelkarper een soort waarvan de populatie met behulp van herbepotingen op peil wordt gehouden. In de meeste gevallen gaat het om adulte dieren. Indien de focus meer ligt op de groei en verspreiding kunnen ook juveniele dieren worden gebruikt.

De dieren worden gevangen in het onderzoeksgebied of worden, indien zij niet beschikbaar zijn in het onderzoeksgebied, betrokken bij een kwekerij. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn bij de herintroductie van een soort zoals de steur of de zalm. Deze soorten worden speciaal gekweekt voor herintroductie en het uitvoeren van migratieonderzoek.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

Merk- terugvangst experimenten geven inzicht in de migratie, verspreiding, conditie en groei van de proefdieren. De methode kan ook een waardevolle aanvulling vormen op telemetrisch onderzoek. Door gebruik te maken van een uitwendig merk met een unieke code en meldnummer kan informatie van terugvangsten worden verzameld. Met name bij de visuitzettingen of herintroductie. Er zijn geen alternatieven om dit uit te voeren, zonder dat er sprake is van een dierproef. Omdat er specifiek gekeken wordt naar het individuele migratiegedrag van vissen in een polder-, beek- en riviersystemen is het noodzakelijk deze te voorzien van een merk.

Indien er geen noodzaak is om vissen individueel te volgen, maakt VisAdvies gebruik van een techniek waarbij migrerende vissen kunnen worden geregistreerd met een FishCounter. Met behulp van onderwaterbeelden kan de vis op soort worden gebracht. Dit biedt een goed alternatief voor telemetrisch onderzoek, waarmee vervanging van een dierproef wordt gerealiseerd.

Het aantal proefdieren wordt bepaald op basis van een afweging tussen de verwachte resultaten en het benodigde aantal waarnemingen. Dit is sterk afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Indien een vissoort sterk gemotiveerd is om te migreren (bijvoorbeeld een schieraal) is het aantal benodigde proefdieren lager dan bij een soort waarvan verwacht wordt dat zij minder migratiegedrag vertonen. Aangezien terugmeldingen voornamelijk afkomstig zijn van sport- en beroepsvissers wordt de vangkans ook meegenomen bij het bepalen van het aantal proefdieren. Gezien deze onzekerheden en het feit dat het onderzoek in een ongecontroleerde omgeving wordt uitgevoerd, bestaan er geen modellen of statistische methoden om het aantal proefdieren te bepalen. Wel kan de keuze worden gemaakt om het merken van de proefdieren in fasen uit te voeren. In dat geval kunnen de resultaten van de eerste batch worden gebruikt voor het bepalen van het aantal proefdieren voor de nieuwe batches. Dit is echter niet in alle onderzoeken mogelijk omdat de periode waarin de vissen moeten worden gemerkt te klein kan zijn om deze strategie toe te passen.

De keuze voor het type tag is afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Er wordt gebruik gemaakt van zo klein mogelijke tags. De tijd tussen het vangen en merken van de proefdieren wordt zo kort mogelijk gehouden door contact te onderhouden met de persoon die verantwoordelijk is voor het op locatie vangen van de proefdieren. Op die manier kunnen de proefdieren vrijwel direct naar de vangst worden gemerkt en uitgezet. Tijdens het inbrengen van het merk worden de vissen verdoofd. Een keuze voor een lagere diersoort is niet mogelijk omdat specifiek wordt gekeken naar het migratiegedrag van bepaalde vissoorten.

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

De periode tussen vangen en merken wordt bij voorkeur zo kort mogelijk gehouden om stress en angst te beperken. In de meeste gevallen worden de vissen binnen enkele uren gemerkt en uitgezet. Voorafgaand aan het inbrengen van het merk worden de proefdieren in het stadium van chirurgische verdoving gebracht. Na de ingreep worden de dieren zo snel mogelijk uitgezet in hun natuurlijke omgeving. Op basis van experimenten met het inbrengen van zendertjes en tags is de kans op mortaliteit is zeer beperkt. Belangrijk hierin is dat het formaat van de zender of tag wordt afgezet tegen het formaat van de vis. Hiervoor worden standaard richtlijnen toegepast. De handelingen worden uitgevoerd door vakbekwaam en gekwalificeerd personeel.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

De wens voor een telemetrisch onderzoek komt vaak voort uit een kennislacune. Door de verantwoordeijk onderzoeker wordt gekeken in hoeverre er gegevens beschikbaar zijn uit de literatuur. Omdat het onderzoek zich meestal in een specifiek onderzoeksgebied wordt uitgevoerd, is er in veel gevallen bekend wat er in het verleden is uitgevoerd.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

Van huisvesting is geen sprake omdat de proefdieren kort na vangst worden gemerkt en weer worden uitgezet in hun natuurlijke omgeving.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Gevangenschap

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Om de proefdieren te kunnen merken worden ze eerst gevangen. Dit kan met zowel passieve als actieve vistuigen worden gedaan. De periode tussen vangst en uitzetten (gevangenschap) kan voor de vis als angstig worden ervaren.

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

De tijd tussen vangst en uitzetting wordt zo kort mogelijk gehouden. Passieve vangstopstellingen worden afgedekt om de kans op stress en predatie te voorkomen.

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

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

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

Matig ongerief is te verwachten op grond van de implantatie (onder anesthesie) van uitwendige tags. Het vangen, in opslag houden en eventueel transport zal ook ongerief veroorzaken.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja





Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Geachte heer, mevrouw,

Onderstaand het advies van de DEC aangaande het project

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

1. Aanvraagnummer: **AVD22300002015110**
2. Titel van het project: Vissen zwemmen heen en weer
3. Titel van de NTS: Vissen zwemmen heen en weer
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-DLO  
[Redacted]  
Secretaris: [Redacted]
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 14-4-2015  
Aanvraag compleet: 14-4-2015  
In vergadering besproken: 24-4-2015
7. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 29-04-2015  
Strekking van de vragen:
  - De DEC heeft enkel suggesties gedaan voor tekstuele aanpassingen
  - De DEC heeft informatie gevraagd over de grootte en het gewicht van de te gebruiken tagsDatum antwoorden: 30-4-2015 en 01-5-2015  
De antwoorden hebben geleid tot tekstuele aanpassing van de aanvraag.

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

Dierexperimenten  
Commissie DLO

DATUM  
1 mei 2015

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD22300002015110

UW KENMERK  
AVD22300002015110

POSTADRES  
[Redacted]

BEZOEKADRES  
[Redacted]

INTERNET  
www.wur.nl

KVK NUMMER  
09100600

CONTACTPERSOON  
[Redacted]

TELEFOON  
[Redacted]

E-MAIL  
[Redacted]

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.

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

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het reële belang van het project, te weten direct toepasbare kennis vergaren die nodig is voor het ontwikkelen en evalueren van maatregelen die moeten leiden tot rivierherstel, herstel van vismigratie en efficiëntie van vispassages, wordt door de DEC onderschreven.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheid: Deze experimenten kunnen alleen in de natuurlijke biotoop uitgevoerd worden omdat migratiegedrag niet op een andere manier bepaald kan worden. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit stress van het vangen, in opslag houden en eventueel transport en het onder verdoving inbrengen van een zender of tag.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Migratiegedrag kan uitsluitend in het doel dier bepaald worden. Het gebruik van een FishCounter is alleen mogelijk wanneer dieren niet individueel gevolgd hoeven te worden en om die reden voor het nu voorgestelde project niet inzetbaar.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Voor dit type onderzoek bestaan geen statistische modellen waarop de aantallen proefdieren gebaseerd worden, wel is reeds ervaring opgebouwd. Door het project te faseren kan op basis van de resultaten uit de eerste batch bepaald worden hoeveel dieren er in de volgende batch nodig zijn. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De zenders en tags worden onder verdoving ingebracht en de tijd tussen vangst en merken wordt zo kort mogelijk gehouden. Er wordt gebruik gemaakt van kleine tags en het minimaal vereiste formaat van de vissen wordt vooraf bepaald. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. De NTS is naar het oordeel van de DEC een evenwichtige weergave van het project, begrijpelijk geformuleerd en voldoet aan de vereisten in de herziene Wod Art. 10.a.1.7.

DATUM  
1 mei 2015

PAGINA  
3 van 3

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

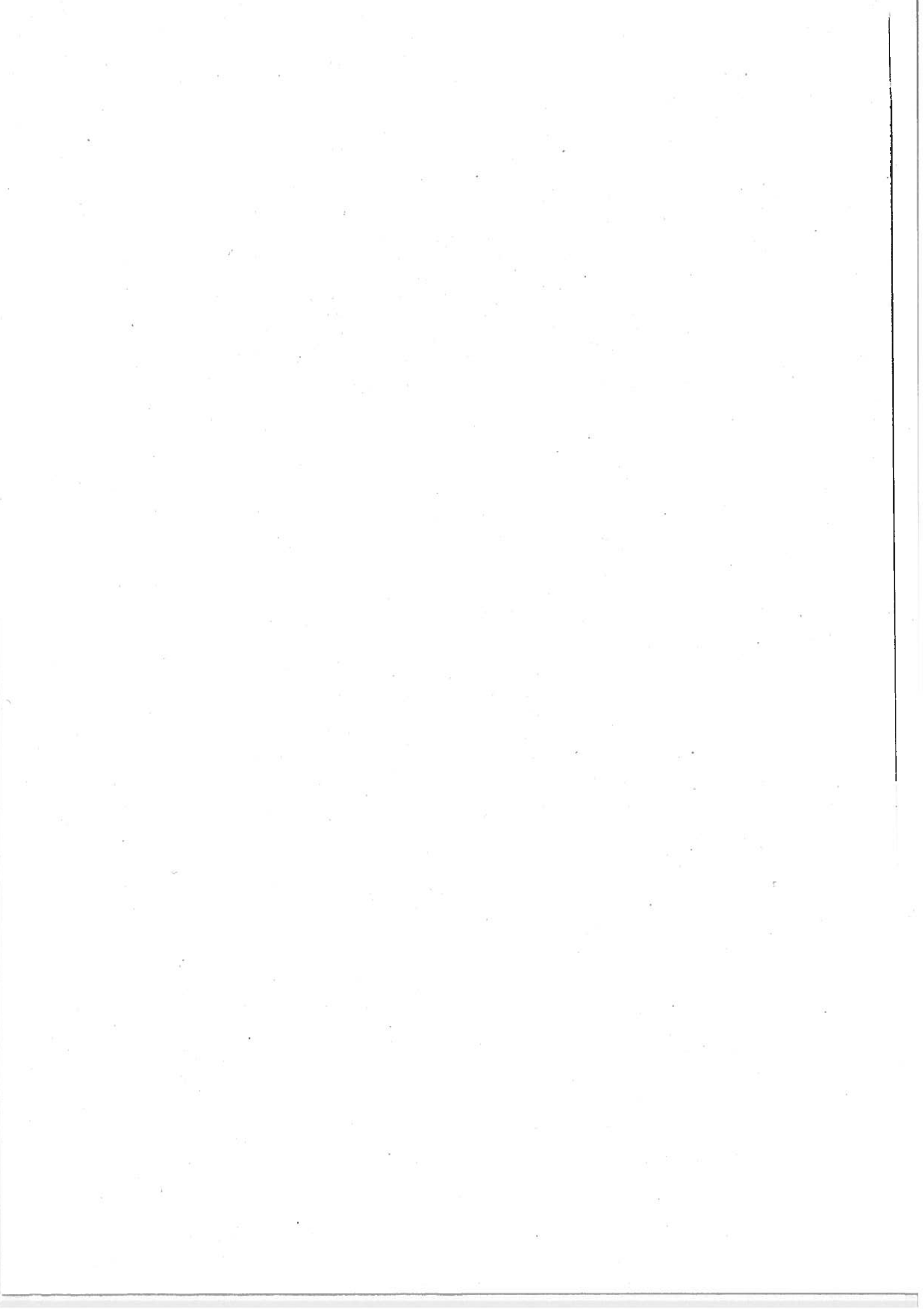
- De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan een verbetering van het welzijn van vissen, een uitbreiding van de biodiversiteit en een goed watermanagement. De DEC merkt op dat de oplossingen (vistrappen en andere kunstwerken) duur zijn en door de maatschappij opgebracht moeten worden. Dit nadeel weegt echter niet op tegen de voordelen die het project kan genereren. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD:
  - De DEC adviseert unaniem de vergunning te verlenen.

Met vriendelijke groet,







## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

- |                              |                                |
|------------------------------|--------------------------------|
| 1.1 Titel van het project    | Vissen zwemmen heen en weer    |
| 1.2 Looptijd van het project | 1-6-2015 tot 1-6-2020          |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Vis, migratie, zenderonderzoek |

## 2 Categorie van het project

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

### 3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)
- Vissen hebben gedurende hun leven een gebied nodig dat voldoet aan hun eisen. Het gebied waarin een vis leeft kan soms op grote afstand liggen van de geboorte- en voortplantingslocatie. Vissen zwemmen hiervoor heen en weer (migratie) om deze gebieden te bereiken. Een bekend voorbeeld is de aal, die zich na de geboorte op zee laten meevoeren met de stroming tot ze de kust bereiken en het binnenwater intrekken. Na enige jaren keert de volwassen aal terug naar zee om zich na een tocht van 6000 kilometer voort te planten in de Saragossa zee.
- Migrerende vissen worden op verschillende manieren bedreigd. Door de mens aangelegde kunstwerken, zoals gemalen, sluisen en waterkrachtcentrales, zijn weliswaar vanuit een maatschappelijk, economisch en sociaal oogpunt onmisbaar. Tegelijkertijd vormen zij echter een bedreiging voor migrerende vissen. De afgelopen jaren is door waterbeheerders veel werk verricht om veel van deze kunstwerken passeerbaar te maken door het aanleggen van bijvoorbeeld vispassages. Dit zijn een soort omleidingen met kleine trapjes waarmee vissen het peilverschil in kleine stapjes kunnen overbruggen.
- Het project heeft als doel om inzicht te krijgen in enerzijds het migratiegedrag van vissen in hun natuurlijke omgeving en anderzijds de migratieknelpunten.
- 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?
- De kennis die wordt verkregen is van groot wetenschappelijk belang. Het onderzoek levert essentiële kennis op die nodig is om het succes inzake rivierherstel, herstel van vismigratie en de efficiëntie van vispassages te evalueren. Met deze kennis kunnen we de migratiemogelijkheden verbeteren en werken aan het herstel van de visstand. Soorten als de zalm en de steur die in het verleden zijn verdwenen uit onze wateren kunnen zich straks weer handhaven.
- 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?
- Voor dit project worden naar schatting 4000 vissen gebruikt, waarvan 3000 voor zenderonderzoek en 1000 voor merk-terugvangst experimenten.
- 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?
- Bij zenderonderzoek en merk-terugvangst experimenten worden de vissen tijdelijk in gevangenschap gehouden, voorzien van een zendertje of merk en vervolgen uitgezet in hun natuurlijke omgeving. De gevolgen blijven dan ook beperkt tot stress bij het inbrengen van het zendertje of het merk en eventuele complicaties gedurende de periode van herstel. De kans op sterfte is zeer beperkt.
- 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de
- Voor zowel zenderonderzoek als merk-terugvangst experimenten wordt matig ongerief verwacht voor alle proefdieren.

verwachte ernst?	
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De vissen worden na het inbrengen van het zendertje of merk uitgezet in hun natuurlijke omgeving.

## 4 Drie V's

4.1 <b>Vervanging</b> Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	Telemetrieonderzoek wordt ingezet om inzicht te krijgen in het individuele migratiegedrag van vissen. Er zijn geen alternatieven om dit uit te voeren, zonder dat er sprake is van een dierproef. Omdat er specifiek gekeken wordt naar het individuele migratiegedrag van vissen in een polder-, beek- en riviersystemen is het noodzakelijk deze te voorzien van een merk.
4.2 <b>Vermindering</b> Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	Het aantal proefdieren wordt bepaald op basis van een afweging tussen de verwachte resultaten en het benodigde aantal waarnemingen. Dit is sterk afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Indien een vissoort sterk gemotiveerd is om te migreren (bijvoorbeeld een schieraal) is het aantal benodigde proefdieren lager dan bij een soort waarvan verwacht wordt dat zij minder migratiegedrag vertonen. Gezien deze onzekerheden en het feit dat het onderzoek in een ongecontroleerde omgeving wordt uitgevoerd, bestaan er geen modellen of statistische methoden om het aantal proefdieren te bepalen. Wel kan de keuze worden gemaakt om het merken van de proefdieren in fasen uit te voeren. In dat geval kunnen de resultaten van de eerste batch worden gebruikt voor het bepalen van het aantal proefdieren voor de nieuwe batches. Dit is echter niet in alle onderzoeken mogelijk omdat de periode waarin de vissen moeten worden gemerkt te klein kan zijn om deze strategie toe te passen
4.3 <b>Verfijning</b> Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diermodel(len) de meest	De keuze voor de telemetrie methode is afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Er wordt gebruik gemaakt van zo klein mogelijke tags. De minimale afmetingen (lengte en gewicht) van de proefdieren wordt vooraf bepaald op basis de afmeting van de zender of tag.

verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project.

Een keuze voor een andere diersoort is niet mogelijk omdat specifiek wordt gekeken naar het migratiegedrag van bepaalde vissoorten.

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

De tijd tussen het vangen en merken van de proefdieren wordt zo kort mogelijk gehouden door contact te onderhouden met de persoon die verantwoordelijk is voor het op locatie vangen van de proefdieren. Op die manier kunnen de proefdieren vrijwel direct na de vangst worden gemerkt en uitgezet.

Tijdens het inbrengen van het zendertje of de tag worden de vissen verdoofd. De handelingen worden uitgevoerd door vakbekwaam en gekwalificeerd personeel.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

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

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

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

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

Migrerende vissen worden op verschillende manieren bedreigd. Door de mens aangelegde kunstwerken, zoals gemalen, sluizen en waterkrachtcentrales, zijn weliswaar vanuit een maatschappelijk, economisch en sociaal oogpunt onmisbaar. Tegelijkertijd vormen zij echter een wezenlijke bedreiging voor migrerende vissen.

Belangrijke beleidsstukken zoals de kader richtlijn water (KRW), Habitatrictlijn, Benelux beschikking en de Europese Aalverordening hebben ervoor gezorgd dat het faciliteren van vrije vismigratie een vaste plek heeft in het landelijke en Europese beleid.

Vanuit de beleidsopgaven uit de bovengenoemde stukken, hebben waterbeheerders de afgelopen jaren vele projecten uitgevoerd die hebben bijgedragen aan het opheffen van migratiebarrières en het herstellen van paai- en opgroeigebieden. Dit heeft ertoe geleid dat uitgestorven vissoorten zoals de zalm weer terug zijn in onze rivieren.

Een zeer belangrijk onderdeel is het inzichtelijk maken van de vismigratie. Zijn gerealiseerde vispassages passeerbaar en kunnen de paai- en opgroeigebieden daadwerkelijk worden bereikt? Zijn er nog knelpunten voor een verder herstel of herintroductie van populaties?

Dit voorstel omschrijft het project "vissen zwemmen heen en weer" waarin meerdere dierproeven worden uitgevoerd. Deze proeven hebben een sterke inhoudelijke samenhang, namelijk het inzichtelijk maken van het vismigratiegedrag en vismigratieknelpunten.

#### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het project heeft als doel om inzicht te krijgen in enerzijds het migratiegedrag van vissen in hun natuurlijke omgeving en anderzijds de migratieknelpunten. Dit is onderverdeeld in een aantal doelstellingen:

- Het inzichtelijk maken van de verspreiding en het migratiegedrag van vissen. Wat is het rendement van vispassages en kunnen de vissen de stroomop- of afwaarts gelegen paai- en opgroeigebied daadwerkelijk bereiken? Deze kennis is van essentiële belang voor het vormen en evalueren van herinrichtingsprojecten, het ontwerpen van vispassages en de prioritering inzake het wegnemen van vismigratieknelpunten.
- Het inzichtelijk maken van de mate waarin uitgezette (bedreigde) vissoorten zich kunnen handhaven binnen hun leefgebied. Kunnen ze zich ontwikkelen en wat zijn eventuele knelpunten (visserij, migratie, etc.) voor herstel of herintroductie?

De haalbaarheid van het project kan op basis van eerder uitgevoerd onderzoek als hoog worden beschouwd. De onzekere factoren zitten met name in het verkrijgen van voldoende proefdieren en de mate waarin de dieren migratiegedrag vertonen. Lokale beroepsvissers worden ingezet voor het vangen van de proefdieren. Zij hebben veel kennis van de visstand en het viswater en weten dit te vertalen naar het vangen van voldoende proefdieren. Het migratiegedrag van de vissen is afhankelijk van vele factoren. De meetstrategie (opstelling stations) speelt een belangrijke rol voor de haalbaarheid van het project. Door bijvoorbeeld aan te tonen dat vissen zich wel aanbieden bij een vispassages maar deze niet passeren kan toch de doelstelling worden bepaald. Voor wat betreft merk-terugvangst experimenten wordt het resultaat grotendeels bepaald door het aantal terugmeldingen. Door in de voorbereidende fase voldoende richtbaarheid te geven aan het onderzoek kan de respons worden vergroot. Zo worden berichten geplaatst in vakbladen en wordt een beloning uitgereikt aan de persoon die vangst meldt.

### **3.3 Belang**

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

Het project heeft zowel een wetenschappelijk als een maatschappelijk belang.

De kennis die wordt verkregen is van groot wetenschappelijk belang. Het onderzoek levert essentiële kennis op die nodig is om het succes inzake rivierherstel, herstel van vismigratie en de efficiëntie van vispassages te evalueren. Met deze kennis kunnen we de migratiemogelijkheden verbeteren en werken aan het herstel van de visstand. Soorten als de zalm en de steur die in het verleden zijn verdwenen uit onze wateren kunnen zich straks weer handhaven.

Schoon water is van belang voor diverse maatschappelijke sectoren (drinkwater, bedrijven, landbouw, recreatie, visserij en natuur). Om dit voor elkaar te krijgen zijn verschillende richtlijnen vastgesteld, waaronder de Kader richtlijn water (KRW). De KRW gaat uit van de stroomgebiedsbenadering en de Europa-brede aanpak om de chemische en ecologische waterkwaliteit te verbeteren. De overheid stelt hierbij de normen vast voor verschillende kwaliteitselementen, waaronder vis. De visstand is een graadmeter voor de wijze waarop wij met ons leefmilieu omgaan. Gaat het met de visstand goed, dan gaat het ook goed met de overige natuur en het milieu in en om het water. De uitvoering van de KRW brengt de nodige verplichten met zich mee zoals het oplossen van migratiebarrières (stuwen, gemalen) ter bevordering van de vismigratie en de visstand. Om knelpunten en barrières op te lossen moeten deze in kaart worden gebracht. Fundamenteel onderzoek is bij aanvang daarom van essentieel belang voordat de knelpunten opgelost kunnen worden. Andere richtlijnen zoals de Benelux beschikking vrije vismigratie, EU Aalverordening, het Masterplan trekvis Rijn en het Masterplan trekvis Maas stellen dezelfde verplichtingen.

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

Om de doelstelling van het onderzoek te behalen zijn een tweetal onderzoeksmethoden te onderscheiden:

1. Telemetrisch onderzoek;
2. Merk-terugvangst experimenten;

Met telemetrisch onderzoek wordt het migratiegedrag van vissen inzichtelijk gemaakt. Daarmee worden vragen beantwoord over de efficiëntie van vispassages en de mate waarin vissen paai- en opgroeigebieden kunnen bereiken. Bij het proefdier wordt inwendig een zendertje ingebracht waarmee deze individueel kan worden gevolgd binnen een onderzoeksgebied. De vissen worden hierbij geregistreerd op vaste of mobiele meetstations. Daarmee kan inzichtelijk worden gemaakt in hoeverre vispassages passeerbaar zijn en of de proefdieren binnen het onderzoeksgebied vrij kunnen migreren.

Merk- terugvangst experimenten geven inzicht in de migratie, verspreiding, conditie en groei van de proefdieren. De methode kan ook een waardevolle aanvulling vormen op telemetrisch onderzoek. Door gebruik te maken van een uitwendig merk met een unieke code en meldnummer kan informatie van terugvangsten worden verzameld. Met name bij de visuitzettingen of herintroductie van een soort is het belangrijk om de groeiontwikkeling, migratie, verspreiding en bedreigingen (bijvoorbeeld visserij) inzichtelijk te maken.

---

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

---

#### **Telemetrisch onderzoek**

Telemetrisch onderzoek wordt ingezet om inzicht te krijgen in het migratiegedrag van verschillende vissoorten. De te gebruiken telemetrie techniek is afhankelijk van de vissoort en het onderzoeksgebied. Zo kan bijvoorbeeld de migratie van salmoniden in de grote rivieren het best worden gevolgd met een techniek die gebruikt maakt van een actieve transponder. De vissen kunnen afhankelijk van het type tag tot ca. 4 jaar worden gevolgd.

Voor kleinschaligere wateren wordt gebruik gemaakt van PIT telemetrie, waarbij de antenne de tag activeert. Voordeel van deze techniek is dat de vissen gedurende hun verdere leven kunnen worden gevolgd, waardoor jaarlijkse variatie inzichtelijk kan worden gemaakt.

In een omgeving met beperkte afmetingen, bijvoorbeeld een inlaat van een waterkrachtcentrale, is de inzet van 3D telemetrie een optie. Hierbij wordt gebruik gemaakt van akoestische tags en hydrofoons. Het gedrag kan in groot detail inzichtelijk worden gemaakt waarmee bijvoorbeeld de effectiviteit van visgeleidingssystemen kan worden aangetoond.

#### **Merk-terugvangst**

Bij merk-terugvangst onderzoek wordt gebruik gemaakt van een uitwendig merk. Deze zijn er in verschillende vormen en maten, bijvoorbeeld een Floy-tag, WOT-tag of VI-tag. Afhankelijk van de vissoort wordt de meest geschikte tag toegepast.

Terugvangsten kunnen worden gedaan door sport- en beroepsvissers.

---

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

---

Alle bovengenoemde onderdelen hebben hetzelfde doel, namelijk om inzicht te krijgen in enerzijds het migratiegedrag van vissen in hun natuurlijke omgeving en anderzijds de migratieknelpunten.

Om binnen het grotere doel te komen tot een vrije vismigratie van (beschermde/kwetsbare) soorten zijn verschillende typen dierproeven nodig. Afhankelijk van de soort en het gebied wordt de te volgen strategie bepaald, mede op basis van wat al voor deze soort of gebied bekend is. Dit kan ook een combinatie van twee technieken zijn. Merk-terugvangst experimenten vormen soms een belangrijke aanvulling op telemetrisch onderzoek. Op deze wijze kan er gelijktijdig inzicht worden verkregen in enerzijds de migratieroutes en anderzijds de overige knelpunten (bijvoorbeeld overmatige visserij) voor herstel van de populatie.

Indien bijvoorbeeld een zalm in staat is om bovenstrooms gelegen paaigebieden te bereiken en zich voort te planten, kan overmatige visserij tijdens de stroomafwaartse migratie van de nakomelingen een grote bedreiging vormen.

De vraag van de markt is vooraf niet geheel te voorspellen. Hierdoor is het vooraf lastig om inzichtelijk te maken wanneer welke onderzoeken precies worden uitgevoerd en in welke volgorde. We weten echter wel op basis van de in het verleden uitgevoerde onderzoek wat de markt op grote lijnen vraagt. Dit is dan ook het uitgangspunt voor dit project.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Telemetrisch onderzoek
2	Merk-terugvangst onderzoek
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

[Redacted]

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** donderdag 30 april 2015 14:43  
**Aan:** [Redacted]  
**Onderwerp:** RE: Aanvraag projectnummer

Goedmiddag meneer [Redacted]

Hierbij ontvangt u uw aanvraagnummer AVD 22300002015110. U dient het aanvraagnummer duidelijk te vermelden, als u de aanvraag verstuurt.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)  
Nationaal Comité advies proefdierbeleid

-----  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 AV | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
-----

---

**Van:** [Redacted] [@visadvies.nl](mailto:[Redacted]@visadvies.nl)  
**Verzonden:** donderdag 30 april 2015 13:56  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** Aanvraag projectnummer

Geachte heer/mevrouw,

VisAdvies is voornemens om zeer binnenkort bij de CCD een projectvergunning aan te vragen. Ter voorbereiding is het projectplan getoetst door de DEC ASG Lelystad. Ze gaven aan dat voor het opstellen van het advies een nummer nodig is dat door de CCD is toegekend. Graag zou ik alvast dit nummer aanvragen zodat het advies van de DEC kan worden opgemaakt.

Projecttitel: Vissen zwemmen heen en weer.  
Looptijd: 1-6-2015 – 1-6-2020.  
Aanvrager : VisAdvies  
Deelnemernummer instellingsvergunninghouder: 22300 )

Met vriendelijke groet,  
[Redacted]



---

[Redacted]  
Veluwehaven 43  
Postbus 2744  
3430 GC Nieuwegein

[Redacted]  
e. [Redacted] [@visadvies.nl](mailto:[Redacted]@visadvies.nl)  
w. [www.visadvies.nl](http://www.visadvies.nl)

*De informatie opgenomen in dit bericht kan vertrouwelijk zijn en is uitsluitend bestemd voor de geadresseerde. Indien u dit bericht onterecht ontvangt, wordt u verzocht de inhoud niet te gebruiken en de afzender direct te informeren door het bericht te retourneren.*

---



Geen virus gevonden in dit bericht.

Gecontroleerd door AVG - [www.avg.com](http://www.avg.com)

Versie: 2014.0.4800 / Virusdatabase: 4311/9661 - datum van uitgifte: 04/30/15



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VisAdvies

Postbus 2744  
3433PW Nieuwegein  
Nederland

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD223002015110

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
factuur

Datum 07 mei 2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven  
Geachte heer/mevrouw,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 4 mei 2015  
Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven is AVD223002015110  
Gebruik dit nummer als u contact met ons 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 ontvangen. Zodra uw aanvraag compleet is, krijgt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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. U heeft aangegeven via eenmalige incasso te willen betalen, helaas is dit voor ons technisch nog niet mogelijk. Onze excuses hiervoor. Wij willen u vragen de factuur binnen 30 dagen na dagtekening te voldoen.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

**Datum**

7 mei 2015

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD223002015110



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

VisAdvies

Postbus 2744  
3433PW Nieuwegein  
Nederland

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD223002015110

Factuurdatum	07 mei 2015
Vervaldatum	06 juni 2015
Factuurnummer	AVD223002015110
Betreft	Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Omschrijving**

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD223002015110

**Bedrag**

€ 741,-

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



1

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

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	
		KvK-nummer	
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	
		Postbus	
		Postcode en plaats	
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |     |
|------------|-----|
| Startdatum | - - |
| Einddatum  | - - |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |  |
|-------------|--|
| Naam DEC    |  |
| Postadres   |  |
| E-mailadres |  |

## 4 Betaalgegevens

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

## 5 Checklist bijlagen

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

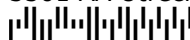
## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	
Functie	
Plaats	
Datum	- -
Handtekening	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht  
Prof. dr. F. Miedema  
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Datum 2 juni 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte ,

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief 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:

#### **Onduidelijkheden**

In uw aanvraag geeft u aan gebruik te maken van zowel konijnen als ratten. Voor konijnen gaat u zowel mannelijke als vrouwelijk dieren gebruiken, terwijl voor ratten alleen mannelijke dieren gebruikt gaan worden. De onderbouwing voor de keuze om alleen mannelijke ratten te gebruiken ontbreekt. De commissie zou graag een goed onderbouwde motivering voor uw keuze willen ontvangen.

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

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

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

#### **Wanneer een beslissing**

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

#### **Meer informatie**



Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum**  
2 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

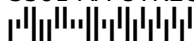


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Datum

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw 

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs. met aanvraagnummer AVD115002015111. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 25 juni 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.


Bijlagen:

- Machtigingsformulier



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

[REDACTED]  
t.a.v. IvD Utrecht  
Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Datum 7 mei 2015  
Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs. met aanvraagnummer AVD115002015111. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 25 juni 2015 een beslissing. Als wij nog informatie nodig hebben, kan dit later worden. Voor een complexe aanvraag staat een langere termijn. In beide gevallen ontvangt u daarover bericht. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

1.1 Vul de gegevens in.

Naam aanvrager

Postcode

3501 AA

Huisnummer

50

1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?

Aanvraagnummer

AVD 115002015111

*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*

### 2 Bijlagen

2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*



Antwoord gestelde vraag "CCD uitleg"

### 3 Ondertekening

3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Naam

Datum

Handtekening

04-06-2015

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

## **CCD uitleg aanvraag 04-06-2015**

### **Ratten algemeen**

Om het aantal gebruikte dieren zo laag mogelijk te houden is een model gewenst waarbij de variatie van botvorming tussen de dieren zo laag mogelijk is. De oestrogeen spiegel in vrouwelijke ratten kan sterk fluctueren onder invloed van stress en leeftijd.(1) Van oestrogeen is aangetoond dat het de bot vorming kan beïnvloeden en zelfs de potentie heeft om botregeneratie te bevorderen.(2, 3) Om deze potentiële oncontroleerbare invloeden te vermijden worden mannelijke ratten geprefereerd in de voorgestelde studies.

Bovendien is aangetoond dat er een verschil is in de hoeveelheid botvorming tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Als deze samen in een studie worden gebruikt, zal de verwachte variatie in botvorming sterk toenemen (4,5)

Mannelijke ratten kunnen daarnaast met meerdere dieren in een kooi gehuisvest worden.

Onderstaand volgt aanvullende uitleg per model.

### ***12 week old – male Harlan Sprague Dawley rats***

Dit mannelijke rattenmodel is gevalideerd in voorgaande experimenten voor het onderzoeken van BMP-2 farmacokinetiek. (6,7) Ook hebben wij verschillende BMP-2 afgifte profielen van [REDACTED] aangetoond in mannelijke Sprague Dawley ratten. (nog niet gepubliceerde data) Het voorgestelde onderzoek gebruikt deze gegevens om de correlatie tussen BMP-2 afgifte profielen en bot formatie aan te tonen tijdens nieuwe tijdstippen en omstandigheden. Voor onderzoek naar BMP-2 farmacokinetiek in andere (vrouwelijke of gecombineerde) modellen zal opnieuw validatie nodig zijn.

Voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat BMP-2 farmacokinetiek van subcutane implantaten vergelijkbaar is met orthotopische implantaten.(7) Dit biedt de unieke mogelijkheid om BMP-2 farmacokinetiek te correleren met botformatie in een botdefect model. Hiervoor is het gebruik van mannelijke Sprague Dawley ratten, waarin de farmacokinetiek van BMP-2 is bewezen, evident. [REDACTED]

### ***12 week old – Fischer 344 Inbred Rat***

Mannelijke Fisher 344 ratten zijn een van de meest gebruikte modellen voor studies naar botregeneraties (1985-nu). Er is derhalve veel kennis over botvorming in mannelijke dieren. (8-10)

In voorgaand werk (niet gepubliceerd) hebben we een pilot studie met mannelijke Fisher 344 ratten gedaan als voorbereiding op deze studie. Om variatie in uitleesparameter te reduceren (zoals hierboven beargumenteerd) en de verschillen tussen voorgaande studies en deze studie te minimaliseren hebben we ervoor gekozen exact het zelfde diermodel te gebruiken. De Fischer 344 ratten zijn, in tegenstelling tot de Sprague Dawley ratten, inteelt ratten en wat syngene transplantatie van cellen mogelijk maakt. Het is gebleken dat bij het gebruik van allogene MSCs van uitteelt ratten, in vivo botvorming niet plaats vindt (11).

1. Arakawa K, Arakawa H, Hueston CM, Deak T. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. *Neuroendocrinology*. 2014;100(2-3):162-77. PubMed PMID: 25300872.

2. Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and Biochem Mol Biol. 2009 Apr;114(3-5):180-5. PubMed PMID: 19429449. Pubmed Central PMCID: 2682591.
3. Calis M, Demirtas TT, Atilla P, Tatar I, Ersoy O, Irmak G, et al. Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue-engineering study. Plastic and reconstructive surgery. 2014 Apr;133(4):499e-510e. PubMed PMID: 24675202.
4. Sample SJ, Racette MA, Hao Z, Thomas CF, Behan M, Muir P. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. PloS one. 2012;7(9):e43215. PubMed PMID: 22984413. Pubmed Central PMCID: 3439425.
5. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, Perka C, Duda GN, Kasper G. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. Bone. 2009 Dec;45(6):1065-72
6. Kempen DH, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, et al. Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering. Biomaterials. 2008 Aug;29(22):3245-52. PubMed PMID: 18472153. Pubmed Central PMCID: 2577841. Epub 2008/05/13.
7. Kempen DH, Yaszemski MJ, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Britson J, et al. Non-invasive monitoring of BMP-2 retention and bone formation in composites for bone tissue engineering using SPECT/CT and scintillation probes. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. 2009 Mar 19;134(3):169-76. PubMed PMID: 19105972. Epub 2008/12/25.
8. D'Mello S, Elangovan S, Hong L, Ross RD, Sumner DR, Salem AK. Incorporation of copper into chitosan scaffolds promotes bone regeneration in rat calvarial defects. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2014 Sep 17. PubMed PMID: 25230382. Pubmed Central PMCID: 4363304.
9. Durbin SM, Jackson JR, Ryan MJ, Gigliotti JC, Alway SE, Tou JC. Resveratrol supplementation influences bone properties in the tibia of hindlimb-suspended mature Fisher 344 x Brown Norway male rats. Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme. 2012 Dec;37(6):1179-88. PubMed PMID: 23050779.
10. Nishimoto SK, Chang CH, Gendler E, Stryker WF, Nimni ME. The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histological evidence for decreased bone formation capacity. Calcified tissue international. 1985 Dec;37(6):617-24. PubMed PMID: 3937585.
11. Sempuku T, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S. Osteogenic potential of allogeneic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics: a histological study. J Orthop Res. 1996 Nov;14(6):907-13.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA Utrecht



**Centrale Commissie Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Datum 12 juni 2015  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2015 tot en met 30 juni 2017.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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



**Datum**  
12 juni 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

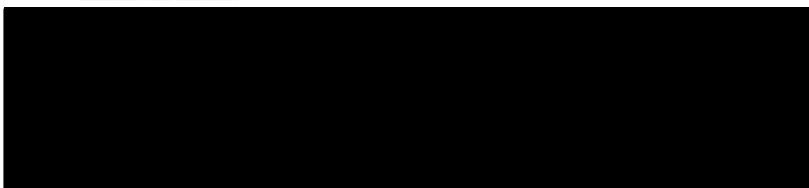
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163.

**Bijlagen**

- Vergunning
  - Hiervan deeltmakend:
    - DEC-advies
    - Weergave wet en regelgeving



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef        |
|------------|-----------------------|
| 1          | subcutaneous ratmodel |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Specific aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

- Describe early responses for the designed constructs and correlate the differences to the various release profiles.
- Integrate early tissue response information (enhancement factors) in new bone construct design.
- Select most effective BMP-2 pharmacokinetic profile for in vivo bone formation.

Aim 2: Translate BMP gene therapy to rat ectopic bone formation

- a. Assess effectivity of BMP gene delivery at ectopic site
- b. Define optimal conditions with respect to construct composition

#### Aim 1

A pharmacokinetic study already confirmed that the BMP-2 incorporation/absorption in the different hydrogel/scaffold components results in different in vivo release profiles in a subcutaneous rat model. The subcutaneous rat model will also be used to compare the effect of different in vivo BMP-2 release profiles on the early tissue response. The scaffolds will be implanted bilateral subcutaneously in the thoracolumbar area up to two weeks. The early phase tissue response is very important for understanding the mechanism of BMP-2 on bone formation and isolating BMP-2 enhancement or inhibition factors. Therefore two early time points are selected for this study. Rats will receive multiple subcutaneous implants which will be analysed at within the first two weeks. Since the scaffolds are small (cylinders with an estimated length of 6 mm and a diameter of 3 mm), duplicates are implanted to allow investigation of both the cellular response by histology and the gene expression profiles of the recruited cells. The effect of BMP-2 is very local and will not affect other study conditions in the rat. Negative control conditions used to confirm this. Implantation of all study conditions in the same animal allows for paired measurements of the outcome parameters. With a randomised block design (also known as a "within-subject" design) the animal effect can be excluded as a variable in the statistical analysis, which leads to a reduction in the animals needed.

Overview of ectopic study conditions early tissue response (samples are implanted in a randomized manner)

1. Burst release group: [REDACTED] with empty microspheres and BMP-2 absorbed into the hydrogel
2. 50% burst release and 50% sustained release group: [REDACTED]
3. Sustained release group: [REDACTED] in microspheres
4. Control groups:
  - a. collagen sponge with BMP-2 absorbed into the sponge (this is the clinical BMP-2 product and will be the positive control)
  - b. non-loaded [REDACTED] (negative control)

Outcome parameters:

In vivo tissue response and bioactivity is determined by histology, immunohistochemistry, molecular biology techniques for gene expression such as polymerase chain reaction (PCR) and  $\mu$ CT (bone volume).

#### Aim 2

The aim is investigated by comparing different cell sources as a target cell for BMP-2 gene therapy. We want to compare MSCs with other potential target cell types in their ability to induce bone formation in vivo. Furthermore, to improve BMP-2 gene therapy, a combination can be made with other genes, such as BMP-4, BMP-6, BMP-7 (OP-1) and BMP-9. These are genes that are upregulated during fracture healing, and have shown in our in vitro work to improve osteogenic differentiation of MSCs.

In this screening study, several conditions will be tested:

Three different target cell types.

BMP-2 gene, and BMP-2 gene in combination with other potential genes.

This will result in ten different conditions.

A small animal screening model is mostly suited for this. A subcutaneous rat model with multiple implantations per animal (10 subcutaneous implants per rat) is the most effective, as it allows for paired measurements (in a randomized block design), resulting in a reduction of the animals needed, as explained above. From previous work we know that the groups will not affect each other, as BMPs are degraded quickly in the bloodstream. Positive and negative controls are included.

Outcome parameters:

Fluorochrome labels will be administered after 3 and 6 weeks of implantation. The implants will be removed after 9 weeks of implantation to evaluate the bone formation by histology.

---

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

---

Animal procedures

The rats are allowed to acclimatize for 1 week before the start of the experiment.

Anesthesia protocols

All operations will be performed under general anesthesia. For induction, isoflurane will be used. During the surgical procedures, isoflurane is used for adequate anesthesia. Analgesia is provided by subcutaneous injection of pain medication (usually buprenorphine) minimum of 2h before surgery.

Pain management

Pre operative and post-operative analgesia is provided by subcutaneous injections of analgetics (usually buprenorphine) minimum of 2h before surgery and twice a day for 72 hrs post-operatively.

Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. After shaving, the skin will be disinfected with Iodine and surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive antibiotic prophylaxis.

Surgical technique subcutaneous implants in rats (1,2) (estimated duration: 0,5h)

The rats will undergo the surgical procedure once. After shaving, disinfecting and sterile draping, small skin incisions are made in the thoracolumbar area. At each site, a subcutaneous pocket is created and filled with one implant. The skin is sutured using resorbable sutures.

Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described and housed together at the animal facilities of the Central Laboratory Animal Institute at the University of Utrecht. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The rats will be returned to social housing after they have recovered from anesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum.

Euthanasia protocols

---

The rats will be euthanized according to one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU (usually by an overdose of CO2 inhalation), after which the implants are retrieved. The analysis of the outcome parameters will be done post-mortem.

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," *Biomaterials* 2008:29:3245-52

2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," *Journal of Controlled Release* 2008:130:15-21

---

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

Male Harlan Sprague Dawly rats

Aim 1. Describe early responses for the designed constructs and correlate the differences to the various release profiles.

To show a relevant difference in bone volume (primary outcome) a minimum number (n) of 10 is estimated based on a power analysis and previous research. Furthermore multiple conditions are implanted in one animal to reduce the amount of animals needed.

Taken together, we estimate that 20 rats are needed.

Male Fischer 344 (IcoCrI)

Aim 2. Assess effectivity of BMP gene delivery at ectopic sites

To show a relevant difference in bone volume (primary outcome) a minimum number (n) of 15 is estimated. Based on previous work in the F344 model with BMP-2, the expected difference in means between conditions is lower than aim 1, furthermore more comparisons are made, therefore the alpha is adjusted.

Therefore based on a power analysis a higher n is calculated. As stated before multiple conditions are implanted in one animal to reduce the amount of animals needed.

Taken together, we estimate that 15 rats are needed

---

## **B. De dieren**

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

Species, origin, estimated numbers, life stages

Aim 1: 12 week old - Male Harlan Sprague Dawly rats will be used (outbred strain). This rat model has proven to be very good and efficient screening model for evaluation of BMP-2 pharmacokinetics (1,2).

20 Rats are needed

Aim 2: 12 week old - Male Fischer 344 (IcoCrI), 6-12 weeks will be used (inbred strain). The Fischer 344 rats have been chosen as an animal model as they are inbred, and have allowed for the syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells between different rats without rejection (3). As explained in the 'coherence' part of the project proposal: BMP induced osteogenesis is comparable between subjects.

15 Rats are needed

Number total

35, See justification statistical method

Species, origin, life stages explanation

Release parameters of the OPF BMP2 construct investigated by our group were proven for this animal species, gender and stock. Identical conditions are needed to further investigate the BMP-2 pharmacokinetics.

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," Biomaterials 2008:29:3245-52
2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," Journal of Controlled Release 2008:130:15-21
3. Chatterjea et al. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. Cell Mol Med. 2014.

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Replacement

There are in this stage no relevant in vitro options available to study bone formation in a biomaterial for bone regeneration and preclinical studies are required to develop safe regenerative medicine strategies for human applications.

Reduction

By combining the rat femoral defect study with additional subcutaneous implants, the animals are used to make an efficient comparison of various

parameters. See statistics for the justification.

#### Refinement

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment.
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- The rats will receive adequate anesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered till 3 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- Resorbable sutures will be used to minimize irritation post operatively
- In vivo bone formation analysis will be done under adequate anesthesia and this narcosis will also be used for administration of the fluorochrome markers in the same session.
- Follow up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.

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

The rats will have 1 week to acclimatize a to the new environment before surgery. We will observe respiration continuously during surgery. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op. For specific information see refinement.

### Herhaling en duplicering

#### E. Herhaling

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

Niet van toepassing

### Huisvesting en verzorging

#### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

The rats will be housed conform the standards of the animal lab. They will be housed in groups of two. If the acclimatization period points out non-desired circumstances like aggression the rats will be housed separately. Food and water will be given ad libitum.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Pre-operative: Light stress during pain medication and induction of anaesthesia.
2. Light stress postoperatively after subcutaneous implantation with adequate pain medication.
3. Light stress during CO2 intoxication.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. 1 week to acclimatize to new environment before surgery. Adequate use of isoflurane.
2. Adequate pain medication.
3. Follow protocol for CO2 intoxication euthanasia

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.



Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanised.

Seldomly, after implantation, a local infection of the implant occurs. This is considered a human endpoint, as animal well being is negatively affected and outcome measurements are not trustworthy anymore.

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

The probability is very low. (<1%)

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

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

The procedure is classified as mild (licht).

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

The rats need to be euthanized to harvest the scaffolds for immunohistochemistry, histology and gene expression of the recruited cells (endpoints project).

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef   |
|--------------------------------|--|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Subcutaneous + orthotopic rat model"/> |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In this part two animal experiments are described in which the same procedure will be used. In total 125 rats (two strains) are needed for this part: Every animal will receive the same procedure:

1. A six millimeter femoral defect (orthotopic defect), in which bone graft substitute material is investigated.
2. To make optimal use of the animals, without significantly more harm, six subcutaneous pockets are created in each animal in which different conditions will be compared. These samples will be implanted in a randomized manner.

The following aims will be investigated in the model described above:

#### Aim 1

Correlate BMP-2 release profiles with early tissue responses and late bone formation.

- a. Select most effective BMP-2 pharmacokinetic profile for in vivo bone formation.
- b. Describe early responses for the constructs with various release profiles.
- c. Integrate the knowledge from the first s.c. rat study on early tissue response information by several enhancement factors in new bone construct design.

#### Orthotopic defect:

Since osteoconduction and periosteal bone formation are important factors that influence bone formation, several BMP-2 release profiles will be compared in an orthotopic site in 80 rats. To determine the efficiency of the different release profiles to heal the critical sized defect, 2 dosages will be tested for each implant.

#### Ectopic defect:

To compare the bone formation at an orthotopic and ectopic location, one subcutaneous site will receive a construct with identical composition as implanted in the femoral defect. The other 5 locations will be used to further improve our understanding of in vivo BMP-2 induced bone regeneration in the OPF constructs. These samples will be studied using a randomized design. Since we calculated that a sample size of n=10 will be sufficient to determine differences between the groups, a total of 8 enhancement/inhibitory factors can be investigated in the 80 rats needed for the orthotopic study.

#### Outcome:

In vivo bone formation will be measured by microCT analysis at 3 time-points after implantation. Fluorochrome labels will be administered at 2 time-points after implantation to evaluate the onset of bone formation. The implants will be removed within 10 weeks after implantation to quantify bone formation by histology and  $\mu$ CT.

#### Overview of orthotopic study (femoral defect) conditions, late tissue response

[REDACTED]

Overview of subcutaneous (ectopic) study conditions, late tissue response. These constructs will be implanted in a randomized manner.

1. Study condition implanted in the rat femoral defect
2. OPF + BMP-2 alone
3. OPF + BMP-2 + Enhancement/inhibition factor (type of enhancement or inhibition factor is based on the results of early tissue response study)

4. [REDACTED]

6. collagen sponge with BMP-2 absorbed (this is the clinical BMP-2 product and will be the positive control)

#### Aim 2

Based on the results of the first experiment (subcutaneous screenings model), conditions will be chosen (see flowchart; Aim 2). The primary outcome measurement will be orthotopic bone formation as a result of non-viral gene therapy in optimized conditions. We estimate that based on the previous study, we will have at least three candidates for further testing in the orthotopic environment. With the proper positive control and negative control this makes 5 study conditions. Estimated number of animals for 5 study conditions is a total of 45 rats.

To further develop the non-viral gene delivery technology, bone replacement constructs will be optimized in subcutaneous locations. Variables are concentration of construct components, such as type and concentration of hydrogel used. These components are expected to influence the process of bone formation and therefore cannot be properly tested in vitro. To reduce the number of animals needed, multiple implant locations per animal will be used. Apart from the femoral defect, each rat will receive 6 subcutaneous implants in the thoracolumbar area.

#### Outcome:

In vivo bone formation will be measured by microCT analysis at 3 time-points after implantation. Fluorochrome labels will be administered at 2 timepoints after implantation to establish the onset of bone formation. The implants will be removed within 10 weeks after implantation to evaluate the bone formation by histology and  $\mu$ CT.

---

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

#### Animal procedures

The rats are allowed to acclimatize before the start of the experiment.

#### Anesthesia protocol

All operations will be performed under general anesthesia. For induction, isoflurane will be used. During the surgical procedures, isoflurane is used for adequate anesthesia. Analgesia is provided by a subcutaneous injection of pain medication (usually buprenorphine), minimum of 2h before surgery.

#### Pain management

Pre operative and post-operative analgesia is provided by subcutaneous injections of analgetics (usually buprenorphine) minimum of 2h before surgery and twice a day for 72 hrs post-operatively.

#### Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. After shaving, the skin will be disinfected with Iodine and surgical site will be draped. To reduce perioperative infection risk, all rats receive antibiotic prophylaxis.

#### Surgical technique femoral defect & subcutaneous implants (1-3)

The surgical procedure is describe in detail previously (see reference 1). In short: the femur is exposed through a lateral incision of the skin and division of the underlying fascia. A plate is fixed to the anterolateral side of the femur. Screws are used to fix a plate on the femur, subsequently a 6 mm long bone segment is removed, and the bone substitute is placed press-fit into the defect site. After insertion of the implant into the defect, the fascia and skin are sutured in layers using resorbable sutures.

Furthermore small skin incisions are made in the thoracolumbar area to create subcutaneous pockets in which the s.c. implants are placed. This is the same procedure as in animal form 1.

#### Postoperative care

The animals are postoperatively treated with the analgesic as previously described and housed together at the animal facilities of the Central Laboratory Animal Institute at the University of Utrecht. The animals will be placed under heat lamps postoperatively. The rats will be returned to social housing after they have recovered from anaesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op.

#### Bone regeneration measurements.

For the in vivo bone formation analysis by microCT, the rats are sedated using isoflurane. The rats will be scanned twice after implantation. Post mortem, the final scan will be made. Furthermore, the rats will receive fluorochrome markers at 2 timepoints postoperatively.

#### Euthanasia protocols

The rats will be euthanized according one of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU (usually an overdose of CO<sub>2</sub> inhalation) after which the implants are retrieved

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," *Biomaterials* 2008:29:3245-52
2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," *Journal of Controlled Release* 2008:130:15-21
3. J. van der Stok, M.K.E. Koolen, H. Jahr, N. Kops, J.H. Waarsing, H. Weinansand O.P. van der Jagt, "chondrogenically differentiated mesenchymal stromal cell pellets stimulate endochondral bone regeneration in critical-sized bone defects", *European cells and materials* (2014), 27, 137-148

---

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

A power analysis is performed; furthermore the amount of animals is calculated for the orthotopic defects, as the subcutaneous implants are less. To show a relevant difference in histology scoring, immunohistochemistry scoring and bone volume ( $\mu$ CT) a minimum number (n) of 10 is estimated.

Aim 1. To determine the effect of BMP-2 release and dosage on bone regeneration in a critical sized rat segmental bone defect

Orthotopic implants: 8 study conditions \* 10 (n) = 80 implants

Calculation: 80 implants / 1 implant site per rat = 80 rats in total.

Aim 2. To determine the effect of non-viral BMP-2 gene therapy on bone formation in a critical sized rat segmental bone defect.

Orthotopic implants: 5 study conditions \* 10 (n) = 50 implants

---

Calculation: 50 implants / 1 implant site per rat = 50 rats in total.

Total animal number

Since the rats will receive 1 femoral defect implant and 6 subcutaneous implants, a total of (80 + 50) rats are needed.

Previous research has shown a 10% drop out rate using the described methods. Therefore a total number of  $88 + 55 = 143$  (aim 1 + aim 2) is asked.

---

## B. De dieren

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

Species, origin, estimated numbers, life stages

Aim 1: 12 week old - Male Harlan Sprague Dawley rats will be used (outbred strain). This rat model has proven to be very reliable and efficient screening model for evaluation of BMP-2 pharmacokinetics (1,2).

88 Rats are needed

Aim 2: 12 week old - Male Fischer 344 (IcoCrI), 6-12 weeks will be used (inbred strain). The Fischer 344 rats have been chosen as an animal model as they are inbred, and have allowed for the syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells between different rats without rejection (3). As explained in the 'coherence' part of the project proposal: BMP induced osteogenesis is comparable between subjects.

55 Rats are needed

Number total

143, See justification statistical method

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," *Biomaterials* 2008:29:3245-52

2. DHR Kempen, L.Lu, KL Classic, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Non-invasive screening method for simultaneous evaluation of in vivo growth factor release profiles from multiple ectopic bone tissue engineering implants," *Journal of Controlled Release* 2008:130:15-21

3. Chatterjea et al. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. *Cell Mol Med*. 2014.

---

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

##### Replacement

There are in this stage no relevant in vitro options available to study bone formation in a biomaterial for bone regeneration and preclinical studies are required to develop safe regenerative medicine strategies for human applications.

##### Reduction

By combining the rat femoral defect study with additional subcutaneous implants, the animals are used to make an efficient comparison of various parameters. See statistics for the justification.

##### Refinement

- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment.
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- The rats will receive adequate anesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered till 3 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- Resorbable sutures will be used to minimize irritation post operatively
- In vivo bone formation analysis will be done under adequate anesthesia and this narcosis will also be used for administration of the fluorochrome markers in the same session.
- Follow up will be daily for one week after surgery, after that a minimum of one time weekly.

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

The rats will have 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. We will observe respiration continuously during surgery. The animals will be placed under heat lamps post operatively. The rats will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia and maintained on rodent chow and water ad libitum. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op. For specific information see refinement.

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

The rats will be housed conform the standards of the animal lab. They will be housed in groups of two. If the acclimatization period points out non-desired circumstances like aggression the rats will be housed separately. Food and water will be given ad libitum.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Pre-operative: Light stress during SC injection and light stress during anesthetic induction with isoflurane. – mild
2. Light stress postoperatively after subcutaneous and orthotopic implantation with adequate pain medication. – mild
3. Light stress during uCT and fluorochoime markers injection under isoflurane – mild



4. Light stress during CO2 intoxication – non recovery

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

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

1. 1 week to acclimatize to new environment before surgery. Adequate use of isoflurane
- 1,3. Adequate depth of narcosis, observe respiration, tail pinch test
2. Adequate observation of vital signs of the animals post-operatively
4. Follow protocol for CO2 intoxication euthanasia

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Rats will be closely monitored on general well being. If abnormalities are observed, the veterinarian will be consulted, and based on the severity of discomfort the animal will be euthanised.

Seldomly, after implantation, the femoral fixation plate will loosen and the animals will lose the ability to adequately walk.

OR

A local infection occurs.

These complications are considered a humane endpoint, as animal well being is severely affected and outcome measurements are not trustworthy anymore.

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

Very unlikely.

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

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

The procedure is classified as moderate (matig).

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

The rats need to be euthanized to harvest the scaffolds for histology (endpoints project).

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer                     | Type dierproef  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Intramuscular pockets in rats and rabbits, combined with orthotopic model in rabbits"/> |

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

#### 2 Beschrijving dierproeven

##### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In the in vivo situation, bone stimulating factors such as BMP-2, act in concert with inflammatory mediators to induce repair after bone damage. In line with this, we observed a synergistic effect of BMP-2 with a number of inflammatory mediators in vitro (e.g. TNF-alpha, IL-17 and LPS) on the differentiation of mesenchymal stem cells into bone cells.

To test the hypothesis that these factors can be used for bone regeneration, their effects will be studied in previously established rat and rabbit models of bone formation. If synergistic effects indeed occur in vivo, the combined use of BMP-2 with inflammatory factors can possibly result in a lower dose of BMP-2 required in the human clinic.

Ectopic sites in rats and in rabbits:

Based on ongoing studies, best performers of inflammatory mediators with respect to bone formation are selected and studied for their synergism with BMP-2. Primary outcome is bone formation, measured by histomorphometry. Experimental groups will contain at least (8 conditions): empty ceramic scaffolds, BMP-2 alone at 2 concentrations (high conc is the positive control), inflammatory mediator(s) of choice used with various delivery strategies (different hydrogels), combinations of BMP-2 (conc 1 and 2) with the inflammatory mediators.

Orthotopic tibia study in rabbits: primary outcome is bone volume compared with the contralateral limb. Four experimental groups are planned:

- Sham control,
- BMP-2 alone,
- BMP-2+inflammatory mediator combination,
- Inflammatory mediator alone

ref tibia model:

---

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

---

Ectopic model: using a single incision, PMMA bone cement discs are implanted intramuscularly and subcutaneously in the dorsum. We have previously used up to 14 samples in rats and 18 samples in rabbits. After 6 weeks, all PMMA bone cement discs are removed from their surrounding membranes, and replaced by porous biphasic calcium phosphate (BCP) scaffolds containing the BMP-2/factors of interest. The implantation of the loaded constructs is always performed in a randomized manner. The implantation of the BCP scaffolds within the developed membranes ('biomembrane'), ensures only local effects of the studied factors. The membranes act as a physical barrier, preventing initial leakage of BMPs and other factors.

This model has been used by our group in the past successfully, without loss of animals. These surgeries are estimated to take 1-2 hours. The animals are estimated to experience mild stress (cumulative).

Orthotopic model (tibia model): This model has also been previously by our group (unpublished results). After disinfection of the skin, the stifle joint is opened with an incision through the skin and the patellar tendon. A hole is drilled into the tibia through the cartilage layer with a hand drill with small diameter (0.5-1 mm). The studied compound is injected into the tibia cavity in a volume of 50-100 ul. The patellar tendon and skin are closed with resorbable sutures. The surgeries are estimated to take 0.5 hour. The animals are estimated to experience mild stress (cumulative).

Anesthesia protocol

Rats: Start with isoflurane/oxygen 4%, and maintained with isoflurane/oxygen 1-2%.

Rabbits: Combination of injection analgetics/anesthetics (in previous experiments, medetomidine subcutaneously, and ketamine and Glycopyrrolate intramuscularly were given during surgery). Anesthesia can be given once more if the surgery takes more than 2 hours (not expected). After that, the rabbits should be intubated.

Pain management

---

All animals receive injection analgetics (usually buprenorphine), with a 12 hours interval, starting before the surgery. This will be continued for a total of 2 days after the operations. If any signs of pain continue (observed during daily scoring of the animals), pain medication will be continued.

#### Antiseptic techniques

All operations will be performed aseptically conditions. The surgeon will wear scrubs, sterile gloves and sterile gown. The surgeon will wear an OR mask and cap. Only autoclaved instruments will be used. After shaving, the skin will be disinfected. All materials introduced into the animals are autoclaved or filtered to ensure sterility. The rabbits will receive prophylactic antibiotics as part of the surgery as they have a higher chance of wound infections.

#### Surgical technique femoral defect & subcutaneous implants

#### Postoperative care

The animals will receive proper post-operative care. The animals will be housed per two (female rabbits) or three (rats) if possible. The animals will be scored daily for well-being in the first week and regularly thereafter. The animals will receive pain medication for two days at minimum, and longer if necessary.

#### Bone regeneration measurements.

In vivo and post-mortem micro-CT imaging at different time points to measure the bone volume (max. 5 times in total). The rats are sedated using isoflurane (1-3.5%). The rabbits are sedated with the same anesthetics as used for the implantations (minimal required doses). Animals will receive fluorochrome markers subcutaneously at three time points to determine the onset and localization of new bone formation by fluorescence microscopy post-mortem. Bone formation will be quantified on histological samples post-mortem (bone area % in porous BCP).

#### Euthanasia protocols

Euthanasia is performed according to one of the methods listed in appendix IV of directive 2010/63/EU.

The rats will be euthanized within 10 weeks after the start of the experiment (usually with an overdose of CO<sub>2</sub> inhalation). The rabbits will be euthanized within 20 weeks after the start of the experiment (usually with an overdose of Pentobarbital i.v.). In the case of rabbits, this will be performed under general anesthesia and pain medication, similar to the surgery procedure.

---

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

A power analysis will be performed; the number of animals needed is calculated based on studies performed previously.

For the ectopic studies, the bone volume (area %) in intramuscularly implanted BCP samples after the endpoint is the primary outcome parameter. Although 8 intramuscular samples (1 control and 7 experimental conditions) can be studied, we usually only compare the effect of 3 different experiment groups to the negative control (e.g. the optimal concentration when different concentrations of BMP-2/inflammatory factor is tested). This should be considered when estimating the value of 'alpha' when performing Bonferroni post-hoc correction. The expected effect size and standard deviation is based on previous rodent

studies where inflammatory mediators were used orthotopically without BMP-2. Therefore, we estimate that 12 rats and 12 rabbits are needed for the ectopic studies.

The orthotopic tibia study has bone volume as primary outcome parameter, comparing the treated limb to the contralateral limb. Effect size and standard deviation are based on a previous study where bacteria were introduced in this tibia model (Croes et al.). With the use of 4 experimental groups needed for the entire study design (i.e. Sham control, BMP-2 only, BMP-2+inflammatory combination, inflammatory factor only), we estimate to use 50 animals.

Total animal number  
12 rats and 62 rabbits

---

## **B. De dieren**

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

Ectopic Models:

- Rats, male Fischer 344 (IcoCrI), age 6-12 weeks.
- Rabbits, male New Zealand White, age 12-16 weeks.

These ectopic pocket models have already been validated and used successfully by our group (unpublished results). The Fischer 344 rats have been chosen as an animal model as they are inbred, and have allowed for the syngeneic transplantation of bone marrow derived stem cells between different rats without rejection (Chatterjea et al. 2014). Although this is not part of the initial plan, the choice of this animal model provides the freedom to combine inflammatory factors/BMP-2 with mesenchymal stem cells in the future. Furthermore, data can be compared to other previous and future BMP-2 experiments in these rats.

Orthotopic model:

- Rabbits, female New Zealand White, age 12-16 weeks.

This orthotopic model has been used before by our group (unpublished results). Identical conditions are needed to further investigate the interaction of BMP-2 with inflammatory factors.

Male rabbits are used for ectopic bone formation studies, as the bone formation induced by BCP ectopically is more strongly induced than in female rabbits. As an example, bone formation can be observed intramuscularly in male rabbits using calcium phosphate materials alone (Yuan, 2006), while this is not the case in female rabbits. This is the most clinically relevant model for our research. For the orthotopic study, female rabbits can be used, which allows for grouped housing. To our knowledge, there is no difference in the orthotopic model between male and female rabbits. Fischer rats are used, as these inbred rats have been used for autologous transplantation of stem cells in previous studies. We therefore already have data on the bone formation in control and BMP-2 groups using BCP. Therefore, no further pilot experiments are necessary.

For orthotopic studies, rabbits are used as their immune system is more comparable to humans than rodents. More specifically, adolescent rabbits are used, as the periosteal bone formation is larger in these animals compared to mature rabbits. This process of periosteal bone formation in rabbits is similar to the clinical situation in man (Vogely 2000).

For rat and rabbit ectopic studies, the age is chosen such to allow sufficient samples in the dorsal region of the animals with minimal cross-over effects of

BMPs and inflammatory mediators.

References :

Cell Mol Med. 2014. Suppression of the immune system as a critical step for bone formation from allogeneic osteoprogenitors implanted in rats. Chatterjea et al.

Tissue Eng. 2006. Cross-species comparison of ectopic bone formation in biphasic calcium phosphate (BCP) and hydroxyapatite (HA) scaffolds. Yuan et al.

J Orthop Res. 2000. Effects of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant-site infection in a rabbit tibial model. Vogely et al.

Number

See justification statistical method

---

**C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

**D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Replacement

Several in vitro studies have already demonstrated the bone stimulating properties of inflammatory mediators on the differentiation of stem cells into bone cells. The complexity of the bone environment and the interaction between immune and bone cells are difficult to mimic in vitro. Furthermore, an interplay between BMPs and inflammatory mediators is required for optimal bone healing in the in vivo situation. To allow sufficient translation into the clinic, suitable in vivo models should be used. The ectopic and orthotopic models have been validated in pilot studies by our group. With these model, we allow for optimal local delivery of BMP-2 in combination with inflammatory factors. The rat model is the smallest screening model suitable for our research, allowing more samples to be implanted per animal than mice. After the screening phase, rabbits are the best animal model as, in comparison to rodents, their immune system is more comparable to humans. Furthermore, larger BCP samples can be used, allowing better translation to the clinical situation. Finally, the results obtained in the rabbit ectopic model can directly be validated in a rabbit orthotopic model, which represents the most relevant situation clinically.

Reduction

The ectopic screening model allows a large number implants to be studied per animal. We have previously used up to 14 samples in rats and 18 samples in rabbits. In these study, there was no loss of any of the animals, nor any unexpected harm. Furthermore, the subcutaneous and intramuscular locations can be easily studied in parallel. As all animals receive all different experimental conditions, the inter-animal variation is reduced allowing for a smaller number of animals for statistical significance. Power analyses are always performed to ensure the use of a minimum number of animals. The most optimal conditions are subsequently tested in the orthotopic model.

#### Refinement

- Skin wounds will be sutured intracutaneously, using resorbable sutures (Monocryl).
- Animals are housed together as much as possible. Only in the case of male rabbits, this will not be possible.
- Animals will have the standard cage enrichment at the [REDACTED]
- The rabbits will receive prophylactic antibiotics to minimize the chance of infection.
- Animals are weighed weekly to monitor health
- Animals will be given 1 week to acclimatize to their new environment
- Eye ointment will be used to prevent dry eyes during surgery.
- During and after surgery the animals will be placed on heat mats.
- Animals will receive adequate anaesthetics to prevent harm during surgery.
- Analgesia medication will be administered till 2 days after surgery to prevent harm post-operatively.
- In vivo bone formation analysis will be done under adequate anaesthesia and this narcosis will also be used for administration of the fluorochrome markers in the same session.
- Surgery method minimized discomfort: for ectopic implantation, a single midline incision will be used. For orthotopic model, the patellar tendon is opened and sutured after the procedure. All other structures of the stifle joint are unaffected allowing optimal recovery.
- Daily scoring of the animals after the operations. Pain medication will be continued if necessary. For rabbits, this is a standard procedure at the GDL Utrecht. For rats, the extra handling for scoring will be requested in the working protocol.

---

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

---

The animals will have at least 1 week to acclimatize to the new environment before surgery. We will observe respiration of the rats continuously during surgery. The rabbits will be monitored for the respiratory and heart function by the biotechnicus at the GDL. The animals will be placed on heat mats postoperatively. The animals will be returned to routine housing after they have recovered from anesthesia. The rats will be maintained on rodent chow. Unrestricted weight bearing and activity will be allowed post-op. For specific information see refinement. The animals will be scored daily by the animal caretakers after the operations. Possible harmful effects of inflammatory mediators will be listed in the working protocol in the animal laboratory so that animal caretakers can take adequate precautions.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

---

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

---



n.v.t.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

The rats and rabbits will be housed conform the standards of the animal lab. They will be housed in groups of two if possible (this have been done for the male Fischer 344 rats and female New Zealand White rabbits in the past without problems). If the acclimatization period points out non-desired circumstances like aggression the rats will be housed separately. Food and water will be given ad libitum.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Cumulative mild (matig) stress is estimated based on the following procedures:

-Operations: mild stress. Due to anesthetics and ectopic implantation of samples. Animals may experience pain in the dorsum after the operation. Animals will have reduced food intake and have weight loss due to the operations. After the orthotopic procedure in rabbits, rabbits will experience pain in affected stifle joint. In the past however, the animals were walking soon after the operation and loading the affected limb.

-Daily scoring of animals after the operation: light stress, due to handling.

-Injection of pain medication subcutaneously: light stress. Due to handling and injection.

-Injection of fluorochrome markers subcutaneously: light stress. Caused by handling. Furthermore, local irritation and colouring of faeces, urine and skin is possible.

In vivo micro-CT scans: light to mild stress. Due to handling, and anesthetic induction (isoflurane in rats, injection of anesthetics in rabbits)

Euthanasia: Light stress, due to handling.

---

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

---

All described measurements are needed to create the least harm for the animals and most secure outcomes for this project.

---

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

1. at least 1 week to acclimatize to new environment before surgery. Adequate use of analgetics and isoflurane (rats) and injection anesthetics (rabbits) during ORs.
3. Rats: adequate depth of narcosis, observe respiration, tail pinch test. Rabbits: monitoring of respiratory and heart function by the biotechnician assisting with the anesthetics at the animal laboratory. The depth of narcosis (twitching/movement) can also be observed by the researcher performing the operation.
2. Adequate observation of vital signs of the animals post-operatively. Scoring of the animals daily after operations by the animal caretakers.
4. Follow protocol for euthanasia, one of the methods listed in Appendix IV of directive 2010/63/EU.
5. Pain medication, starting before the operation, and continued for two days as standard. If there is an indication, pain medication will be extended.

---

## J. Humane eindpunten

---

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

- The rats will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:
  - Weight loss. When weight loss is suspected (reduced food intake), the animals will be weighed daily to monitor welfare.
  - Severe lethargy
  - Severe tachycardia
  - Severe tremor
  - Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
  - Local persistent infection of the implants. The rats will first receive antibiotics in an attempt to treat the infection).
  
- The rabbits will be euthanized in case one or more of the following humane endpoints are observed:

- Weight loss. When weight loss is suspected (reduced food intake), the animals will be weighed daily to monitor welfare (ectopic and orthotopic models)
- Severe lethargy (ectopic and orthotopic models)
- Severe tachycardia (ectopic and orthotopic models)
- Severe tremor (ectopic and orthotopic models)
- Loss of the animals' ability to walk and feed themselves
- Local persistent infection of the implants. The rabbits will first receive antibiotics in an attempt to treat the infection (ectopic model)
- Joint infection with severe pus formation (orthotopic model).

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

Very unlikely.

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

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

The procedure is classified as moderate (matig).

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

The animals need to be euthanized to harvest the scaffolds (ectopic model) and limbs (orthotopic model) for micro-CT and histology.

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

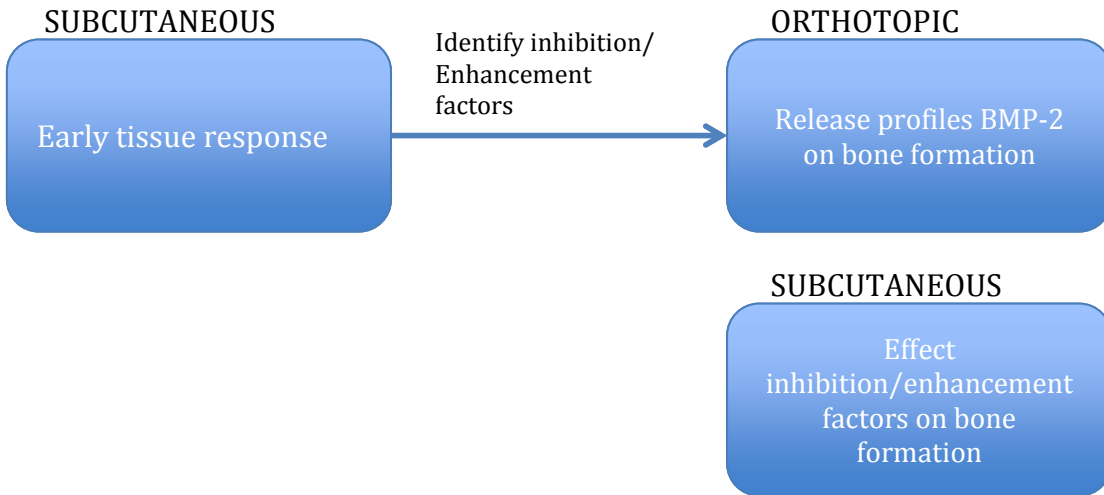
Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

**FLOWCHART AIM 1**

**Experiment 1**

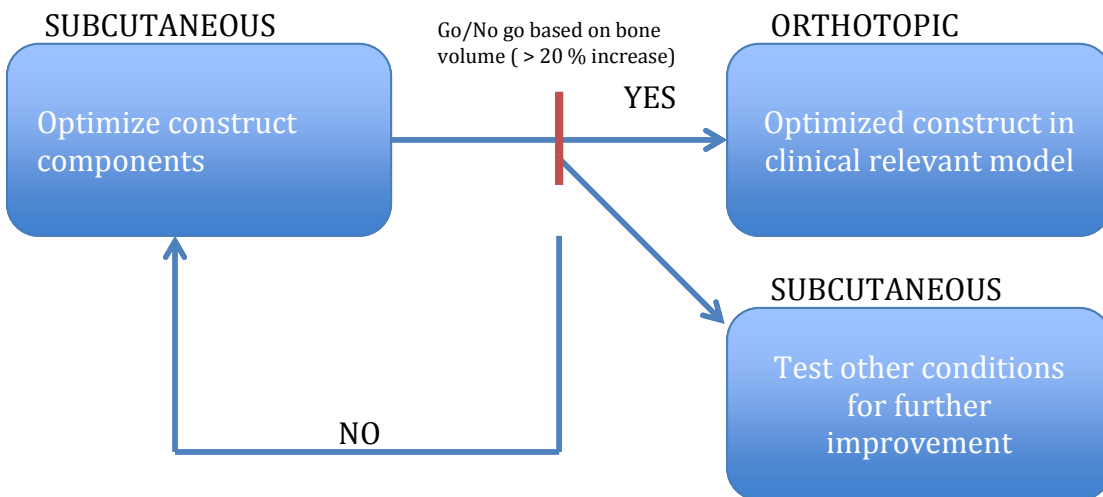
**Experiment 2**



**FLOWCHART AIM 2/3**

**Experiment 1**

**Experiment 2**



**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : **2015.II.115.002**
2. Titel van het project : **The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs**
3. Titel van de NTS : **De rol van groeifactoren in botvorming**

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: **13-03-2015**  
 aanvraag compleet: **13-03-2015**  
 in vergadering besproken: **18-03-2015**  
 anderszins behandeld: **08-04-2015 (e-mailronde)**  
 termijnonderbreking(en) van / tot : **24-03-2015 tot 08-04-2015**  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: **28-04-2015**

## 7. Eventueel horen van aanvrager

- Datum:
- Plaats:
- Aantal aanwezige DEC-leden:
- Aanwezige (namens) aanvrager:
- Strekking van de vraag / vragen:
- Strekking van het (de) antwoord(en):
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag:

## 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **24-03-2015**
- Strekking van de vraag / vragen: **De DEC heeft m.b.t. de NTS de volgende vragen gesteld:**

- 3.1: De DEC adviseert u het doel uitgebreider weer te geven en meer toe te schrijven naar de doelstelling, door het kader weer te geven waarin het onderzoek plaatsvindt (context). Graag aanpassen.
- 4.1: De eerste zin graag anders formuleren door deze concreter te maken en de term 'in vitro' vervangen door een voor de leek meer begrijpelijke term.
- 4.1: U spreekt over geldige en juiste modellen. Graag toelichten wat u hier precies mee bedoelt. Bovendien is het niet duidelijk waarom er eerst genoemd wordt dat voorafgaand onderzoek slechte resultaten gaf en dat er vervolgens verder wordt gewerkt met dezelfde modellen als zijnde het juiste model. Graag helderder weergeven.
- 4.3: De keuze voor de diersoort is niet verklaard. Graag alsnog aangeven waarom u gekozen heeft voor de rat en het konijn en hoe dit bijdraagt aan verfijning van het experiment, temeer daar u stelt dat de resultaten verkregen m.b.v. experimenten in konijnen volgens u beter vertaalbaar zijn naar de mens?

M.b.t. het projectvoorstel heeft de DEC het volgende gevraagd:

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u te verduidelijken waarom het diersmodel dat positieve resultaten heeft opgeleverd, niet transleerbaar bleek naar de kliniek. Het is de DEC niet duidelijk waarom u denkt dat deze studie wel transleerbaar zal zijn. Graag toelichten, waarbij u specificeert wat u in dit model aanpast om de translatiepotentie te verhogen en waarom. Ook graag noemen in punt 3.3, belang.
- 3.1, achtergrond: DE DEC mist informatie over de scaffolds, waarbij u aangeeft of de scaffolds de effectiviteit van BMP-2 al dan niet kan beïnvloeden. Graag aangeven in het projectvoorstel, inclusief eventuele referentie.
- 3.3, belang: De DEC vraagt zich af hoe het samenwerkingsverband met de kliniek is geregeld. Graag toelichten in de projectaanvraag.
- 3.3, belang: De DEC verzoekt u hier tevens aan te geven waarom het relevant is dat met name BMP-2 getest wordt.

**Bijlage 1:**

- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij aim 2 spreekt u over 'several genes', terwijl in de rest van de aanvraag steeds alleen wordt gesproken over BMP-2. Graag verhelderen en/of aanpassen in de aanvraag.
- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Voor de berekening van het aantal benodigde dieren gebruikt u voor de Sprague Dawley ratten een N=10 en voor de F344 ratten een N=15. Het is de DEC niet duidelijk wat hier de ratio van is. Graag verhelderen en indien nodig aanpassen.
- A, Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U gebruikt als experimentele eenheid de scaffold en niet het proefdier. De DEC vraagt zich af of in ieder dier passende controles worden meegenomen om in between animals effecten uit te sluiten. Graag verhelderen.

**Bijlagen, algemeen:**

De DEC heeft de onderzoeker geadviseerd de bijlagen nog eens goed door te nemen met de IvD, omdat deze zeer gedetailleerd zijn weergegeven, hetgeen niet nodig is. Ook is de onderzoeker gevraagd om extra aandacht te besteden aan de humane eindpunten en deze vermelden per model en diersoort.

- Datum antwoord: **08-04-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **N.a.v. de opmerkingen en vragen van de DEC is in de NTS nu duidelijk het doel geformuleerd, zijn lastige termen vereenvoudigd, en zijn gebruikte termen verduidelijkt. Ook is uitgelegd dat voorgaand onderzoek niet tot slechte resultaten leidde, maar dat het laboratorium werk niet voorspellend is voor de situatie in een levend dier, omdat het weefsel zoveel ingewikkelder is. De keuze voor de diersoort is verklaard. Alle antwoorden zijn ook verwerkt in de NTS.**  
**Met betrekking tot het projectvoorstel is de strekking van de antwoorden als volgt:**
  - **De onderzoeker heeft aangegeven dat de term niet transleerbaar eerder is gebruikt met zeer strenge criteria voor de werking van groeifactor BMP-2, nl. in vergelijking met autoloog bot, de huidige standaard in de orthopedie. Dit is feitelijk onjuist, en de werking van BMP-2 in proefdieren (m.n. de rat) in vergelijking met niets doen is wel degelijk voorspelbaar voor de werking in de mens en dus transleerbaar naar de kliniek. In de tekst is nu aangegeven dat BMPs wel degelijk effectief zijn voor botvorming, met name voor spinale fusies, maar dat het succes betwijfeld wordt omdat er in bepaalde gevallen ernstige bijwerkingen gevonden worden. Door aanpassingen in de toedieningsvorm (dosis en duur) zullen de bijwerkingen naar verwachting verminderen/verdwijnen. Informatie over de keuze van de scaffolds en hoe deze een onderdeel vormen van het ontwerp, is toegevoegd. Met alle genoemde scaffolds heeft de onderzoeksgroep ruime ervaring en referenties zijn vermeld.**
  - **De afdeling ██████████ is een zeer gericht op translatie van onderzoeksresultaten naar de kliniek, blijkend uit de voortdurende intensieve interacties tussen onderzoekers en klinici, de ontwikkeling van nieuwe therapieën die daadwerkelijk naar de kliniek worden gebracht en de vele klinische trials die gedaan worden. Daarnaast heeft de onderzoeker uitgelegd waarom juist BMP-2 relevant is in botonderzoek. Als een van de potentste groeifactoren voor botvorming heeft deze factor vooral te kampen gehad met een negatief imago door een aantal gesignaleerde bijwerkingen die het gevolg bleken van de extreem hoge doses aanwezig in de twee FDA goedgekeurde producten (een met BMP-2, en een met BMP-7). Het is een breed gedragen mening, dat het toedienen van een veel lagere dosis (geschat wordt 100-1000 keer lager) met daaraan gekoppeld een juiste timing, zal leiden tot een veel veiliger product. Door de ervaring van de onderzoeksgroep met BMP-2 biologie, expressie en readout essays, en de beschikbaarheid van geschikte afgifte systemen, is gekozen voor BMP-2 als initiële groeifactor, mogelijk uit te breiden met andere groeifactoren (waaronder BMP-7).**
  - **Onder aim 2 zijn de genen gespecificeerd die gebruikt zullen worden om synergie met BMP-2 te bestuderen. Deze genproducten zijn al tijdens in vitro experimenten**

**effectief bevonden voor botregeneratie. Van een enkele, nl. BMP-7, is aangetoond in de literatuur dat de heterodimeer van BMP-2 en BMP-7 een 10-keer hogere affiniteit heeft met BMP receptoren.**

**- Het verschil in aantal dieren is gebaseerd op berekeningen van de power op grond van eerdere spreidingen in de data gevonden voor de verschillende ratten stammen. Dit is nu aangegeven in de tekst.**

**- In samenspraak met de IVD zijn de details globaler gemaakt waar dat kon, en is meer precies omschreven hoe de humane eindpunten gehanteerd zullen worden.**

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: **Ja**

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

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

#### **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. Het project is:

- uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
- uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord.
- wettelijk vereist.

##### 2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

##### 3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. **Het belang wordt ingeschat als substantieel. Bij gecompliceerde breuken, pathologische defecten of bij het grote botdefecten kunnen er problemen zijn met het bothelingsproces. Hierdoor ontstaat de noodzaak tot bottransplantaties of botvervangingsproducten. Jaarlijks worden wereldwijd meer dan 2,2 miljoen bottransplantaties uitgevoerd. Bot transplantaties zijn het meest succesvol met autoloog bot, maar dit heeft ook nadelen, zoals beperkte beschikbaarheid en donorpijn. Het**



**verbeteren van bot vervangende materialen kan bijdragen aan het veiliger en efficiënter gebruik van bot vervangende materialen voor de humane geneeskunde.**

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC acht deze aanpak zeer degelijk omdat er een analyse wordt gedaan van hetgeen nodig is in de verschillende stadia van het proces van botvorming. Relatief nieuw is daarbij onderzoek naar de rol van ontstekingscellen en hun producten.**
5. 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)
  - Gefokt voor dierproeven (11)
  - Zwerfdieren (10h)
  - Hergebruik (1e lid 2)
  - Huisvesting en verzorging
  - Locatie: instelling vergunninghouder (10g)
- De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als mild tot matig. De dieren ondergaan een operatie t.b.v. implantatie, waarbij adequate pre- en post-operatieve pijnstilling wordt gegeven en adequate humane eindpunten worden toegepast. Bij een deel van de experimenten zullen de dieren meerdere malen een onder narcose een CT-scan ondergaan, wat licht ongerief geeft. Na afloop van het experiment zullen de dieren worden geëuthanaseerd om de implantaten uit te nemen en te kunnen analyseren. Gezien deze handelingen is de DEC van mening dat het genoemde ongerief een realistische inschatting is.**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Voor het bestuderen van botvorming is geen goed in vitro model beschikbaar. Ook in vitro onderzoek met botvormende cellen toonde aan dat de resultaten daarvan een slechte overeenkomst vertonen met de werkelijke botvorming. Voor een veilige humane toepassing van nieuwe medicijnen zijn voorafgaande dierstudies wettelijk vereist. Directe toepassing in de mens is daarom niet mogelijk en zijn proefdieren nodig.**

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd. Door twee benaderingen (onderhuids/intra musculair implantaat en botdefect) in één dier te onderzoeken wordt het aantal dieren beperkt. Daarnaast worden door middel van pockets verschillende testruimtes gemaakt in één dier, zodat tegelijkertijd meerdere stoffen en condities kunnen worden onderzocht. Ook maakt deze benadering het mogelijk dat statistisch significante verschillen gevonden worden terwijl minder dieren worden ingezet.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **De DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Bij de opzet is rekening gehouden met dierenwelzijn. Zo krijgen de dieren een week om zich aan te passen aan hun nieuwe omgeving voordat de operatie zal worden gestart. De operaties zullen onder narcose worden uitgevoerd door ervaren chirurgen, er wordt adequate pre- en post-operatieve pijnstilling toegepast, er wordt gebruik gemaakt van resorbeerbare hechtingen en de dieren worden per twee gehuisvest. Tevens wordt na de operatie dagelijks de gezondheid en het gewicht van de dieren bewaakt en zijn heldere humane eindpunten geformuleerd. Ook de MRI metingen vinden plaats onder narcose.**
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

**Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk onderzoeken welke combinatie van groeistimulerende medicijnen, toedieningsmethoden en botweefselconstructie de beste resultaten geeft, substantieel is en opweegt tegen het milde tot matige ongerief dat de dieren in dit onderzoek zullen ondervinden.**

**Door het onder narcose aanbrengen van de, subcutane dan wel intra musculaire, implantaten en het maken van MRI-scans treedt weliswaar mild tot matig ongerief op, maar naar het oordeel van de DEC is gekozen voor de juiste onderzoeksstrategie en zijn deze handelingen noodzakelijk voor het bereiken van het gewenste doel. Het is niet mogelijk om dit onderzoek bij mensen uit te voeren en er zijn evenmin in vitro alternatieven beschikbaar. De DEC acht vertaling van de resultaten naar de mens mogelijk. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.**

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is.
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren.
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag.
  
- 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 een ministeriële ontheffing vereist.
  - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden.
  
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

**bezoekadres**  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

**postadres**  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69  
info@ivd-utrecht.nl  
www.ivd-utrecht.nl

[uw kenmerk](#)  
[ons kenmerk](#)

**datum** 30 april 2015  
**onderwerp** Factuur t.b.v. leges

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u een projectvergunningaanvraag.

#### Correspondentieadres

Ik verzoek u vriendelijk de correspondentie aan portefeuillehouder te verzenden aan de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht. Daarvoor kan in de adressering direct onder de naam van de portefeuillehouder worden vermeld: t.a.v. de Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht, Postbus 12007, 3501AA, Utrecht.

#### Facturering

De vergunninghouder zal de leges voor de bijgaande aanvraag voldoen aan de CCD na ontvangst van de factuur. U kunt op de factuur het onderstaande factuuradres gebruiken en daarbij het vetgedrukte grootboeknummer vermelden.

#### **Factuuradres**

UU -ASC  
postbus 80.011  
3508 TA Utrecht  
o.v.v. **CB.841910.3.01.011**

Ik verzoek u vriendelijk de factuur digitaal in te dienen. Via die route kunnen de leges het snelst worden voldaan. Hiervoor kunt u gebruik maken van het volgende email adres: [info.ascf@uu.nl](mailto:info.ascf@uu.nl).


Het ondertekende aanvraagformulier zal u per separate post worden toegezonden.

Met vriendelijke groet





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht  
t.a.v. ASC  
o.v.v CB.841910.3.01.011  
Postbus 80011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111  
**Bijlagen**

Datum 06-05-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 6 mei 2015  
Vervaldatum: 5 juni 2015  
Factuurnummer: 201570111

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven	€ 741,00
Betreft aanvraag AVD115002015111	

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

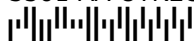


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015111

**Bijlagen**

2

Datum 06-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 april 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015111. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11500

Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 302444197

Postbus:

Postcode en plaats: UTRECHT

IBAN:

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 april 2015  
Geplande einddatum: 1 april 2017  
Titel project: The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs.  
Titel niet-technische samenvatting: De rol van groeifactoren in botregeneratie implantaten.  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting  
Overige bijlagen:  DEC-advies  
 Flowchart; brief tbv leges



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl  
0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002015111

**Bijlagen**

2

Datum 06-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 6 mei 2015

Vervaldatum: 5 juni 2015

Factuurnummer: 201570111

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015111	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



## 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 our website ([www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 Provide the title of the project.

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

### 3 General description of the project

#### 3.1 Background

---

Describe the project (motivation, background and context) with respect to the categories selected in 2.

- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
  - For routine production, describe what will be produced and for which uses.
  - For higher education or training, explain why this project is part of the educational program and describe the learning targets.
- 

Bone tissue has the capacity to heal perfectly, however when complicated fractures, pathological defects or large bone defects have to be bridged, healing processes may fail. This may be the result of insufficient blood supply, infections or even systemic disease may lead to non-unions. This causes the need for bone grafts or bone graft substitutes. Bone is frequently transplanted (over 2.2 million bone grafting procedures annually worldwide) and this is most successful for autologous bone, which unfortunately has several drawbacks such as limited availability and donor site pain. In bone regenerative medicine, much effort is paid to development of hybrid bone replacement grafts, in which the essential components for bone generation are all present. These components are: the cells that form the bone or their progenitors, a suitable osteoconductive biocompatible scaffold and the growth factors that guide new tissue formation, including efficient vascularization.

This project focuses on designing a bone replacement construct, which combines the most efficient set of (growth) factors and scaffolds, in which the scaffold also functions as a controlled delivery system.

Several factors, including growth factors with therapeutic potential have been identified, among which the bone morphogenetic proteins (BMPs) are the most promising as the proteins have shown excellent osteogenic capacity (1,2). Two of them, BMP-2 and BMP-7 are successfully being used in the clinic, especially in spinal fusion procedures. As the use of BMPs at very high dosages increased, many serious complications associated with these new growth factor-based technologies have emerged (7). Since 2011, doubt has been raised concerning the safety of BMPs due to the supraphysiological doses used, and this has led to the general notion that controlled delivery of BMPs at lower dosage is preferred (7-10). As such, this would ensure relevant bioactivity to be present locally at the defect site and at physiological concentrations (11).

BMPs are still the most potent growth factors to induce bone formation, and therefore all efforts are focused on improving the delivery methods and thereby lowering the dosage that is effective for bone formation, while increasing safety. For BMP-2, so far neither the therapeutic window nor the required timing and duration of BMP-2 release are known. Furthermore, it is not known how growth factor release timing affects early events such as cell recruitment and vascularization. Therefore, technologies to determine in vivo availability of the growth factors like BMP-2 have been developed by us and will be used to optimize its site-specific pharmacological actions and subsequent local tissue response. Because bone formation can only be achieved in living individuals, animal models are needed to determine the most optimal delivery strategy for BMPs (this holds true for BMP-2 and other BMPs). The animal models described here are sensitive to BMP treatment and are predictive for the clinical situation, although they show some limitations for translation due to their size. The experimental design is based on implantation of a so-called bone construct, which consists of a scaffold (i.e. carrier) and the growth factors (BMPs or combinations with other growth factors) embedded. The scaffolds are of different nature (polymer scaffolds, ceramic scaffolds or hydrogels) and were chosen based on their proven biocompatibility, biodegradability and binding/release of the BMPs. At the moment it is unknown which scaffold is best suited to stimulate bone formation with the different BMP-2 controlled release formulations.

Our group has wide experience with the application of each of these scaffolds and with the appropriate methods for analysis of bone formation therein (12,

---

18, 19).

#### Correlation of in vivo release profile to tissue response

Studying the effects of different release scenarios of BMP-2 protein on the local tissue response is complicated, as alterations to the growth factors release rate often require changes of the scaffold structure or composition, which will also influence the cellular response to the scaffold and subsequent bone formation. In previous studies we developed a composite formulation with polymer microspheres (i.e. PLGA) embedded in a hydrogel scaffold for bone regeneration which has the ability to tailor the BMP-2 release without changing the main scaffold structure (12). Whereas incorporation of BMP-2 in either the microspheres or the hydrogel allows tailoring of the growth factor release, the scaffold matrix components remain the same and differences in cellular responses and bone formation can be attributed to the growth factor pharmacokinetics. Furthermore, by using a radiolabeled BMP-2 in an in vivo set-up, it became clear that in vitro release profiles are not necessarily reflected in the in vivo availability of the released factor (12-16). This means that after careful selection of the most promising scaffold/delivery system, in vivo experimentation will be necessary to gain conclusions on eventual effectivity with respect to bone formation.

#### Burst release versus sustained release

It is still unknown which is the most efficient release profile for BMPs, and should those release profiles contain a burst release and/or a sustained release. The burst release scenario, which results in a high concentration of BMPs during the early days of implantation, assumes that a critical density of BMP responsive cells and a minimal concentration of BMPs are necessary to induce bone regeneration. In this scenario, BMP is considered an inductive agent which initiates the cascade of bone regeneration.

In a sustained release scenario, it is assumed that cell recruitment at the target site takes time. The surgical procedure and implanted biomaterial initiate an inflammatory response with the release of chemotactic factors that favour recruitment of mesenchymal stem cells (MSCs). The BMP release during the first few days contributes to this response as it stimulates the cytokine and growth factor response of local cells. In this scenario, bone regeneration is coordinated by multiple growth factors and cytokines each playing different roles at different stages. BMPs like BMP-2, -4 and -7 are acting as the differentiation factors, which guide tissue formation towards bone. In the sustained release scenario, the burst release of the majority of the BMP in the early days is considered ineffective as large amounts will be lost in the hematoma at the defect site. Therefore, it is necessary to gain knowledge on the actual requirement of the crucial growth factors like the BMPs within the first weeks of implantation.

#### Delivery of bone stimulatory growth factors through non viral gene therapy

A recently developed strategy to overcome the use of high doses of BMP-2 is BMP-2 gene therapy. Non-viral delivery of the growth factor encoding sequence, in the form of plasmid DNA, has proven to result in a relatively sustained delivery of protein. The non-viral approach has several advantages over viral gene therapy, most importantly the absence of immune reactivity to the vector, no recombination risks and a relatively transient expression pattern, which is suited for bone healing to occur. Non-viral gene therapy strategies for bone repair may either be through a direct in vivo approach, in which endogenous cells are the targets, or transgene delivery is performed ex vivo, whereafter the cells are placed in the bone construct. In previous work we have developed a non-viral gene therapy method in which alginate functions both as the scaffold and the transfection agent. In vitro analysis showed high transfection efficiencies, resulting in adequate transgene (i.e. BMP-2) expression and increasing protein levels over a period of five weeks. Mesenchymal stem cells (MSCs) non-virally transfected with the BMP-2 gene have shown efficient bone formation in a-thymic mice (18,19).

In order to translate this work further, this project aims to show effectivity in rats at different ectopic and orthotopic locations under a variety of conditions.

#### Characterization of early tissue response

Animal models have demonstrated the dose-dependent nature of BMP-2 treatment and its inflammatory response. (20) BMPs also have indirect chemotactic effects on lymphocytes and monocytes. (21) To obtain a better understanding of the cellular and tissue response to BMP treatment of serious bone defects, it

is important to study the early effects after growth factor exposure. Therefore, the present study will investigate the effect of different release strategies on the early inflammatory phase as well as the osteoinductive capacity of the construct over a longer period of time. In addition, as it is known that pro-inflammatory mediators may modulate bone formation positively, the interplay of inflammatory mediators and BMP-2 is being studied. The goal is to identify possible synergistic effects which stimulate bone formation and apply these in bone replacement construct design. For this purpose, ectopic rat and rabbit models of local inflammation in conjunction with bone formation, have been developed at our department. In this model a 'biomembrane' is induced which prevents the leakage of the studied growth factors and inflammatory compounds. Early screening studies are performed in rats, which also allow for screening in combination with more mechanistic studies. For this specific research line, the most effective combinations of BMP-2 and inflammatory mediators are subsequently tested in the available rabbit models. The rabbit offers the advantage that larger constructs can be tested and that its immune system is more comparable to humans. Therefore it is assumed to be a more clinically relevant model in the translation towards humans. In addition, the results obtained in the rabbit ectopic model can be validated in the orthotopic tibia model already used at our department.

1. TK Sampath, AH Reddi, Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981, 78, 7599.
2. MR Urist, Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965, 150, 893.
5. EJ Carragee, EL Hurwitz, BK Weiner, A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 2011, 11, 471.
6. SK Mirza, Commentary: Folly of FDA-approval studies for bone morphogenetic protein. *Spine J* 2011, 11, 495.
7. D Benglis, MY Wang, AD Levi, A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 2008, 62, ONS423.
8. LM Tumialan, J Pan, GE Rodts, PV Mummaneni, The safety and efficacy of anterior cervical discectomy and fusion with polyetheretherketone spacer and recombinant human bone morphogenetic protein-2: a review of 200 patients, *J Neurosurg Spine* 2008, 8, 529.
9. RD Dickerman, AS Reynolds, BC Morgan, J Tompkins, J Cattorini, M Bennett. rh-BMP-2 can be used safely in the cervical spine: dose and containment are the keys! *Spine J* 2007, 7, 508.
10. Committee for Medicinal Products for Human Use, E.M.A. scientific discussion for the approval of Osigraft. <http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/osigraft/039301en6.pdf>, 2004.
11. KR Garrison, S Donell, J Ryder, I Shemilt, M Mugford, I Harvey, F Song, Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. *Health Technol Assess* 2007, 11, 1.
12. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering, *Biomaterials* 2008;29:3245-52
13. PQ Ruhe, OC Boerman, FG Russel, AG Mikos, PH Spauwen, JA Jansen, In vivo release of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement pretreated with albumin. *J Mater Sci Mater Med* 2006, 17, 919.
14. BH Woo, BF Fink, R Page, JA Schrier, YW Jo, G Jiang, M DeLuca, HC Vasconez, PP DeLuca, Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a polymeric matrix. *Pharm Res* 2001, 18, 1747.
15. RH Li, ML Bouxsein, CA Blake, D D'Augusta, H Kim, XJ Li, JM Wozney, HJ Seeherman, rhBMP-2 injected in a calcium phosphate paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res* 2003, 21, 997.
16. K Hori, C Sotozono, J Hamuro, K Yamasaki, Y Kimura, M Ozeki, Y Tabata, S Kinoshita, Controlled-release of epidermal growth factor from cationized gelatin hydrogel enhances corneal epithelial wound healing. *J Control Release*, 2007, 118, 169
17. Southwood, L.L., et al., Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Vet Surg*, 2004. 33(6): p. 565-78.
18. Wegman, F., et al., Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater*, 2011. 21: p. 230-42; discussion 242.

19. Wegman, F., et al., Combination of bone morphogenetic protein-2 plasmid DNA with chemokine CXCL12 creates an additive effect on bone formation onset and volume. (manuscript in preparation).
20. J Zara, RK Siu, X Zhang, J Shen, R Ngo, M Lee, et al. High doses of BMP-2 induce structurally abnormal bone and inflammation in vivo. *Tissue Eng Part A* 2011, 17, 1389
21. KB Lee, SS Murray, CE Taghavi, KJ Song, EJ Brochmann, JS Johnson, et al. Bone morphogenetic protein binding peptide reduces the inflammatory response to BMP-2 and BMP-7 in a rodent model of soft-tissue inflammation. *Spine J* 2011, 11, 568

---

### 3.2 Purpose

Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- If the project is focussed on one or more research objectives, which research questions should be addressed during this project?
- If the main objective is not a research objective, which specific need(s) does this project respond to?

---

The purpose of this project is to obtain knowledge with respect to optimal growth factor delivery in order to design optimal bone replacement constructs.

Aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

- Describe early responses for the designed constructs and correlate the differences to the various release profiles.
- Integrate early tissue response information in new bone construct design.
- Select most effective BMP-2 pharmacokinetic profile for in vivo bone formation.

Aim 2: Translate BMP non viral gene therapy to rat ectopic and orthotopic bone formation

- Assess effectiveness of BMP non viral gene delivery on bone formation in a ectopic and orthopic environment.
- Define optimal conditions with respect to construct composition.

Aim 3: To study the combined effects of proinflammatory mediators and BMP-2 on bone formation

Aim 1:

We will proceed on a project performed by us at the [REDACTED], in which different hydrogel/scaffold constructs were designed and tested for their pharmacokinetic profile. Using radiolabeled growth factor, in vivo retention of BMP-2 was measured for various formulations, leading to selection of constructs with either a burst release or a sustained release profile.

The selected constructs will now be further investigated in detail in a subcutaneous rat model, whereby release profile will be correlated to both early responses (tissue reaction, vascularization) and late responses (bone formation). Finally a rat model, in which a femoral defect will be treated with constructs generating various release profiles of BMP-2, will be used to study effectiveness of the constructs in bone healing.

Aim 2:

BMP non viral gene therapy has been subject of investigation in our group during the last 5 years, and this has lead to in-depth knowledge on this matter. Transgene expression in vitro and subsequent bone formation in a-thymic mouse models has recently been shown. In order to translate this knowledge further, several steps have to be taken: effectiveness of this strategy in a rat model with a normal immune system has to be investigated, and subsequently, this strategy has to be investigated in a critical size bone defect. The rat femoral defect model was chosen as it is very reproducible and robust, allows

longitudinal monitoring using micro CT, and could be combined with ectopic implants, functioning both as internal control and to gain knowledge on the use of different construct compositions.

Aim 3:

In the in vivo situation, bone stimulating factors such as [REDACTED] In line with this, [REDACTED] on the differentiation of mesenchymal stem cells into bone forming cells. If synergistic effects indeed occur in vivo, the [REDACTED]

To test the hypothesis that these factors can be used for bone regeneration, their effects will be studied in previously used rat and rabbit models of bone formation. Early screening studies are performed in rats, which also allow for screening in combination with more mechanistic studies. For follow-up studies, the rabbit model offers the advantage that larger constructs can be tested and that its immune system is more comparable to humans. In addition, the results obtained in the rabbit ectopic model can be validated in the orthotopic tibia model already used at our department.

These aims are achievable within two years:

[REDACTED] has a longstanding expertise in bone research, and all necessary equipment, infrastructure and trained surgeons to perform and guide the project are in place. [REDACTED] extensively tested the polymers used in the proposed project.

Three PhD candidates will work on both projects, therefore enough manpower will be present to do all the work needed.

---

### 3.3 Relevance

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

Bone is, after blood, the most commonly transplanted tissue worldwide. The diverse clinical needs for bone regeneration include application after resection of primary and metastatic tumors, bone loss after skeletal trauma, total joint arthroplasty with bone deficiency, spinal fusion, and trabecular voids. To date, close to 2.2 million bone substitution procedures are performed worldwide each year and given our aging population, this number is expected to increase. The standard and currently most effective treatment for bone defects consists of transplantation of autologous bone. However, the weakness of autograft is its limited supply, donor site morbidity, additional surgical time and difficulty to be modeled into desired shapes. These disadvantages of autograft treatments drive the quest for alternative methods to reconstruct large bone defects.

Bone regeneration based on the delivery of growth factors is an emerging field within tissue engineering research, which has evolved tremendously over the past decades and has the potential to revolutionize bone regeneration strategies. Due to a limited understanding of the biological actions of growth factors and the current clinical experience with BMP-based therapies with serious product-related adverse events, growth factor-based bone regeneration is still under heavy pressure. The challenge facing researchers today is to optimize growth factor delivery, lowering the growth factor dosage and to create the appropriate local environment for bone regeneration within the delivery vehicle. Eventually, this will ensure that patients can safely benefit from these new bone regeneration strategies in future clinical applications. Among the BMP isotypes known to stimulate bone formation, BMP-2 is best studied, also by our group, and therefore the BMP isotype that we focus on initially. Because we have indications that combined delivery with other BMPs (such as BMP-7) or with other growth factors is beneficial to promote bone formation (unpublished results), combined testing will also be performed.

Within the Orthopedics department, researchers and clinicians have worked together for more than a decade to tackle the challenge of bone tissue engineering. We have combined in vitro work with preclinical work in several animal models, and are convinced that the route from small animal models for the initial screenings of most optimal constructs and subsequently testing these in bony defects in larger animal models, is the preferred route to clinical



translation. Our department has brought several products to the clinic and is involved in many clinical trials.

---

### 3.4 Research strategy

---

#### 3.4.1 Provide an overview of the overall design of the project (strategy).

---

Three interconnected aims are described for this project. To investigate these aims a subcutaneous rat model, a subcutaneous combined with an orthotopic rat model and an intramuscular rat and rabbit model are needed. Furthermore, a rabbit intramuscular pocket model is used, as it ensures local effects of inflammatory mediators.

##### Aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

Previous studies have shown that the correlation between in vitro and in vivo BMP-2 release kinetics is very weak (1). A pharmacokinetic study performed at [REDACTED] in a subcutaneous rat model. This proven in vivo BMP-2 release profiles will be used to further investigate the early tissue response of BMP-2 burst and sustained release in a subcutaneous rat model.

Previous studies have shown that other growth factors and cytokines have synergistic activity with BMP-2 (2). Unfortunately little is known about their in vivo cell response mechanism. Based on the results of the early tissue response study, other enhancement and inhibitory factors will be identified which are involved in the early phase of BMP-2 induced bone regeneration. These factors will be investigated in a subcutaneous rat model.

The logical final step will be to investigate the pharmacokinetics of BMP-2 of an optimized construct in an orthotopic rat model.

##### Aim 2: Translate BMP non viral gene therapy to rat ectopic and orthotopic bone formation

Previous work in our group has shown the potential of BMP non viral gene therapy via the transfection method that was optimized at our facility. This gene therapy method has resulted in prolonged transgene expression, BMP production and bone formation in a-thymic mouse models. The immune system has a big influence on gene therapy efficiency as we know from literature. Now the first step is to test different concentrations of plasmid DNA and different combinations of genes and or different target cells in a normothymic model. Subsequently we aim to test the optimized constructs in a orthotopic environment.

The first part therefore consists of a subcutaneous rat screening model in and the logical final step would be to test these optimized constructs in a orthotopic location in the same rat model; the femoral defect.

##### Aim 3: Study of cross-talk between inflammatory mediators and BMP-2

To study multiple conditions of inflammatory mediators in a single animal, it is of importance that the substances used will remain local. This has been achieved by introducing a pocket model which may be applied subcutaneously and intramuscularly. By placement of inert spacers (Masquelet technique), a biological membrane is formed, which can be filled with test constructs for bone regeneration and closed by sutures. This model has been developed in our group (unpublished results) and will be used to study a limited set of mediators in combination with BMP-2. Primary outcome will be bone formation, measured by histomorphometry. Furthermore, immune responses (blood parameters) and cellular effects are investigated by immunohistochemistry.

1. DHR Kempen, L.Lu, TE Hefferan, L Creemers, A Maran, KL Classic, WJA Dhert and MJ Yaszemski, "Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivity in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering," *Biomaterials* 2008:29:3245-52

2. DHR Kempen, L Lu, A Heijink, TE Hefferan, LB Creemers, A Maran, MJ Yaszemski, WJA Dhert, "Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration", *Biomaterials* 2009:30:2816-25

---

---

#### 3.4.2 Provide a basic outline of the different components of the project and the type(s) of animal procedures that will be performed.

---

##### Aim 1: Correlate BMP-2 release profiles with early and late tissue formation

The early tissue response of BMP-2 release profiles will be analyzed after 1 and 2 weeks of subcutaneous implantation. In vivo tissue response and bioactivity is determined by microCT (for bone formation), histology, immunohistochemistry and molecular biology techniques for gene expression such as polymerase chain reaction (PCR).

Enhancement/inhibition factors identified in the early tissue response study will be investigated using a subcutaneous rat model. These enhancement or inhibitory factors will be absorbed in the hydrogel. Since it takes time before bone tissue is formed, investigation of these synergetic or inhibitory effects at a late timepoint provides valuable information on the importance of these pathways during the regeneration process. Tissue formation is determined by microCT and histology.

Since osteoconduction and periosteal bone formation will act as disturbing mechanism on bone formation, BMP-2 release profiles will be compared in an orthotopic site. Bone formation will be analyzed in an orthotopic rat model by microCT and histology.

##### Aim 2: Translate BMP non-viral gene therapy to rat ectopic and orthotopic bone formation

Different concentrations of plasmid DNA and different combinations of genes and or different target cells are studied in a normothymic subcutaneous rat model. Tissue formation is determined by microCT and histology.

Since osteoconduction and periosteal bone formation will influence bone formation, the best performing construct from the first study will be compared in an orthotopic site. Bone formation will be analyzed in an orthotopic rat model by microCT and histology.

##### Aim 3: The role of inflammatory mediators in BMP-2 induced bone formation

Previous in vitro and ongoing in vivo work have identified a limited set of inflammatory mediators with bone promoting characteristics. Dosage information from the ongoing study will be used to design constructs in which release timing and synergism with BMP-2 will be studied. We have experienced that rats, due to their size, are the smallest animal model which allows for screening of various conditions within the same animal. Furthermore, we have observed that conditions in the intramuscular and the subcutaneous environment can be tested in parallel in rats. Therefore, first relatively small samples are studied in rats to screen for the optimal construct. The rat model hereby offers the advantage that more analytical tools are available for this species (e.g. ELISAs, antibodies), allowing for more mechanistic studies such as quantification of the early inflammatory response. In the next phase, larger, more clinically relevant sized samples can be tested in rabbits, as the pocket model has already been optimized for both rats and rabbits. The rabbit model offers a second advantage that its immune system is more comparable to humans than rodents. Therefore, physiological concentrations inflammatory mediators can be tested together with BMP-2. Moreover, in rabbits, an orthotopic tibia model is developed for implant-related infection/inflammation studies, and is used here as it represents a clinical situation.

---

#### 3.4.3 Describe the coherence between the different components and the different steps of the project. If applicable, describe the milestones and selection points.

---

The overall purpose of the project is to obtain more knowledge with respect to optimal (growth) factor release timing for bone replacement constructs. All aims evaluate growth factor based bone tissue engineering and focus on better understanding of the biological activity of these growth factors. Furthermore, the efficiency of several growth factor delivery methods is investigated and their possible interaction with local tissue or immune mediators is investigated. Different rat models are used, i.e. Sprague Dawley and Fischer 344, for BMP-2 release and BMP-2 gene therapy/inflammation studies, respectively. We have experience with both models at our department. The choice of the Fischer 344 rats is based on their inbred nature, allowing for the syngeneic transplantation of mesenchymal stem cells without rejection by the immune system. Cell transplantation is not performed in the BMP-2 release studies.

---

Therefore, the outbred Sprague Dawley model is used to maximize comparability and reproducibility with previous release experiments performed at the [REDACTED]

Multiple studies focusing on the osteogenic potential of BMPs in rats have shown that inter-species differences are minimal. We therefore believe that the results obtained with the different rat models can be compared.

#### Coherence aim 1

First the early tissue response of BMP-2 release profiles is investigated in a subcutaneous rat model. This study will provide data for BMP-2 inhibitory or enhancement factors in the second subcutaneous study. In the same rat model a bone defect will be created to test the BMP-2 release profiles in an orthotopic site.

#### Coherence aim 2

First different constructs components are analysed in a subcutaneous screening model. If bone formation is observed in any of these constructs/conditions the mile stone is reached and the consecutive study is performed, in which in the same rat model the construct is investigated in a orthopic location.

#### Coherence aim 3

Knowledge from ongoing screening studies will be used as it provides dosage information. These results will feed into this aim to design optimal combinations with known bone stimulatory BMP-2. The rat model, due to its size and the availability of most analytical tools for this species, offers the advantage that screening studies can be combined with more mechanistic studies. The most optimal construct from rat studies will then be translated to rabbits, as their immune system is more comparable to human. It is thought that this allows for testing of more physiological concentrations of inflammatory mediators in combination with BMP-2. Furthermore, a model is available in rabbits involving a more clinically relevant orthotopic location.

### 3.4.4 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	Subcutaneous rat model
2	Subcutaneous + orthotopic rat model
3	Intramuscular pockets in rats and rabbits, combined with orthotopic model in rabbits
5	
6	
7	
8	
9	
10	





## 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 woonplaats: 3501 AA Utrecht  
 Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juli 2015 tot en met 30 juni 2017, voor het project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijke onderzoeker is [REDACTED].

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen bij digitale indiening op 30 april 2015 en per post aangepast op 7 mei 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 april 2015;
  - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 30 april 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht d.d. 28 april 2015 en ontvangen op 30 april 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Subcutaneous rat model	- Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Male Harlan Sprague Dawley; Male Fischer 344 (IcoCrI)	35: - 20 Harlan Sprague Dawley mannelijk ratten; - 15 Fischer 344 (IcoCrI) mannelijke ratten;	Licht
Subcutaneous + orthotopic rat model	- Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / Male Harlan Sprague Dawley; Male Fischer 344 (IcoCrI)	143: - 88 Harlan Sprague Dawley mannelijk ratten; - 55 Fischer 344 (IcoCrI) mannelijke ratten;	Matig
Intramuscular pockets in rats and rabbits, combined with orthotopic model in rabbits	- Konijnen ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> ) / mannelijke en vrouwelijke New Zealand White - Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / male Fischer 344 (IcoCrI)	62 konijnen: mannelijke en vrouwelijke New Zealand White 12 ratten: Fischer 344 (IcoCrI) mannelijke ratten;	Matig

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

Volgens artikel 10c van de Wet op de dierproeven (hierna de wet) is het verboden om andere dierproeven uit te voeren dan waar de vergunning voor is verleend. De dierproeven mogen slechts worden verricht in het kader van een project, volgens artikel 10g. Uit artikel 10b volgt dat de dierproeven zijn ingedeeld in de categorieën terminaal, licht, matig of ernstig. Als er wijzigingen in een dierproef plaatsvinden, moeten deze gemeld worden aan de Centrale Commissie Dierproeven. Hebben de wijzigingen negatieve gevolgen voor het dierenwelzijn, dan moet volgens artikel 10a5 de wijziging eerst voorgelegd worden en mag deze pas doorgevoerd worden na goedkeuren door de Centrale Commissie Dierproeven.

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister van Economische Zaken een ontheffing is verleend.

### **Verzorging**

De fokker, leverancier en gebruiker moeten volgens artikel 13f van de wet over voldoende personeel beschikken en ervoor zorgen dat de dieren behoorlijk worden verzorgd, behandeld en gehuisvest. Er moeten ook personen zijn die toezicht houden op het welzijn en de verzorging van de dieren in de inrichting, personeel dat met de dieren omgaat moet toegang hebben tot informatie over de in de inrichting gehuisveste soorten en personeel moet voldoende geschoold en bekwaam zijn. Ook moeten er personen zijn die een eind kunnen maken aan onnodige pijn, lijden, angst of blijvende schade die tijdens een dierproef bij een dier wordt veroorzaakt. Daarnaast zijn er personen die zorgen dat een project volgens deze vergunning wordt uitgevoerd en als dat niet mogelijk is zorgen dat er passende maatregelen worden getroffen.

In artikel 9 staat dat de persoon die het project en de dierproef opzet deskundig en bekwaam moet zijn. In artikel 8 van het Dierproevenbesluit 2014 staat dat personen die dierproeven verrichten, de dieren verzorgen of de dieren doden, hiervoor een opleiding moeten hebben afgerond.

Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving onverenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn 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

**Datum**  
12 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 13c 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 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.

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 12:06  
**Aan:** [redacted]@umcutrecht.nl'; 'info@ivd-utrecht.nl'  
**CC:** [redacted]@umcutrecht.nl'; [redacted]umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** Aangepaste adresgegevens factuur aanvrag AVD115002015111  
**Bijlagen:** Factuur AVD115002015111.pdf

Geachte heren,

Hier ontvangt u de aangepaste factuur (adresgegevens).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028  
E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)



**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** dinsdag 2 juni 2015 12:14  
**Aan:** [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**CC:** info@ivd-utrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** Aanvullende informatie aanvraag AVD115002015111  
**Bijlagen:** Aanvullende informatie AVD115002015111.pdf

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw project aanvraag "The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs" op 30 april 2015 ontvangen en in behandeling genomen. Over uw aanvraag hebben wij nog aanvullende informatie nodig. In bijgaande brief vind u onze vragen.

We hebben de leges voor uw aanvraag ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

*Uitvoeringsexpert*

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)


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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht  
Prof. dr. F. Miedema  
t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht  


**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Datum 2 juni 2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte ,

Op 30 april 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs' met aanvraagnummer AVD115002015111. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief 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:

#### **Onduidelijkheden**

In uw aanvraag geeft u aan gebruik te maken van zowel konijnen als ratten. Voor konijnen gaat u zowel mannelijke als vrouwelijk dieren gebruiken, terwijl voor ratten alleen mannelijke dieren gebruikt gaan worden. De onderbouwing voor de keuze om alleen mannelijke ratten te gebruiken ontbreekt. De commissie zou graag een goed onderbouwde motivering voor uw keuze willen ontvangen.

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

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

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

#### **Wanneer een beslissing**

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

#### **Meer informatie**

Heeft u vragen, kijk dan op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

**Datum**  
2 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015111

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



## Melding

### Bijlagen via de post

- U wilt één of meerdere bijlagen naar ons versturen? Voeg *altijd* deze Melding Bijlagen toe. Wij weten dan welke documenten van u zijn en hoeveel documenten u opstuurt.
- Meer informatie vindt u op [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)
- Of bel met ons: 0900 28 000 28 (10 ct/min).

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** donderdag 7 mei 2015 13:31  
**Aan:** [REDACTED]@umcutrecht.nl; info@ivd-utrecht.nl  
**CC:** [REDACTED]@umcutrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** Acceptatiebrief aanvraag AVD115002015111  
**Bijlagen:** AcceptatieBrief-AVD115002015111.pdf

Geachte heren,

Bijgaand de acceptatiebrief voor aanvraag AVD115002015111 die vandaag ook per post is verzonden aan [REDACTED] t.a.v. IvD Utrecht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 9 juni 2015 15:25  
**Aan:** [REDACTED]@uu.nl  
**CC:** info@ivd-utrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** dubbel betaling aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer/ mevrouw,

Op 29 mei 2015 hebben we een betaling ontvangen voor €741 euro op factuurnummer 201570111 horend bij de aanvraag AVD115002015111. De bankrekening waarvan het geld is overgemaakt is NL69RABO0143774735 op naam van Univers. Med. Centrum.

Op 8 juni 2015 hebben we een andere betaling ontvangen voor dezelfde factuur vanaf de bankrekening NL04ABNA0555129063 op naam van Universiteit Utrecht.

We vragen ons af of ergens een fout is gemaakt en dezelfde factuur per ongeluk dubbel is betaald, of de tweede betaling toevallig bij een andere factuur hoort (misschien 201570113)?

Alvast hartelijk bedankt voor uw antwoord.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

*Uitvoeringsexpert*

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)**

[REDACTED]

---

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** dinsdag 9 juni 2015 11:49  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** AVD115002015111

Hoi,

Er is een betaling binnengekomen van deze aanvrager op 8 juni.  
Op de 29 mei hebben zij de factuur al betaald.  
Waarschijnlijk hebben ze nu dubbelbetaald.  
Kan jij contact met ze opnemen hierover.

Thanks.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)  
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2500 EK | Den Haag  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....

T: [REDACTED]  
E: [REDACTED]@rvo.nl

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 11:29  
**Aan:** ZBO-CCD  
**Onderwerp:** RE: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011  
**Bijlagen:** Factuur AVD115002015111.pdf

**Categorieën:** Dossierhouder: [REDACTED]

Beste,

Factuur is geadresseerd aan UMC Utrecht.  
Daar doen wij de administratie niet van.  
Mocht deze factuur voor de Universiteit Utrecht zijn, dan verzoeken wij het adres te weisgen in:

Universiteit Utrecht  
t.a.v. ASC  
Postbus 80011  
3508 TA Utrecht

Hoop u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED] | Administratief Service Centrum - Directie Financiën, Control & Administratie | Universiteit Utrecht | Heidelberglaan 8 | kamernummer [REDACTED] | ✉ Postbus 80011, 3508 TA Utrecht  
☎ 030-[REDACTED] | 📄 [REDACTED] | @ E-mail: [REDACTED] | 🌐 <http://www.uu.nl> | aanwezig op: maandag t/m vrijdag van 08.00 t/m 16.30 uur

 Denk aan het Milieu. Printen is niet altijd nodig.

---

**Van:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 10:51  
**Aan:** U [REDACTED]  
**Onderwerp:** Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011

Geachte heer/mevrouw,

Na aanleiding van uw verzoek sturen wij bij deze de factuur voor een nieuwe aanvraag projectvergunning, o.v.v. CB.841910.3.01.011 (uw referentie).

Uw wordt vriendelijk verzocht om de leges binnen de vermelde termijn over te maken.

De factuur is ook naar de aanvrager en de verantwoordelijke onderzoeker verstuurd.

De factuur wordt automatisch gegenereerd met de gegevens van de aanvrager.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.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.

[REDACTED]

---

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 12:02  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011  
**Bijlagen:** Factuur AVD115002015111.pdf

Beste,

Bij deze de aangepaste factuur.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

---

**Van:** [REDACTED] [\[REDACTED\]@uu.nl](mailto:[REDACTED]@uu.nl)

**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 11:29

**Aan:** ZBO-CCD

**Onderwerp:** RE: Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011

Beste,

Factuur is geadresseerd aan UMC Utrecht.

Daar doen wij de administratie niet van.

Mocht deze factuur voor de Universiteit Utrecht zijn, dan verzoeken wij het adres te weisgen in:

Universiteit Utrecht

t.a.v. ASC

Postbus 80011

3508 TA Utrecht

Hoop u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED] | Administratief Service Centrum - Directie Financiën, Control & Administratie | Universiteit Utrecht | Heidelberglaan 8 | kamernummer [REDACTED] | ✉ Postbus 80011, 3508 TA Utrecht  
☎ 030-253 4 [REDACTED] | 📠 030- [REDACTED] | @ E-mail: [REDACTED]@uu.nl | 🌐 <http://www.uu.nl> | aanwezig op: maandag t/m vrijdag van 08.00 t/m 16.30 uur



Denk aan het Milieu. Printen is niet altijd nodig.

---

**Van:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]

**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 10:51

**Aan:** [REDACTED]

**Onderwerp:** Factuur aanvraag projectvergunning/ o.v.v. CB.841910.3.01.011

Geachte heer/mevrouw,

Na aanleiding van uw verzoek sturen wij bij deze de factuur voor een nieuwe aanvraag projectvergunning, o.v.v. CB.841910.3.01.011 (uw referentie).

Uw wordt vriendelijk verzocht om de leges binnen de vermelde termijn over te maken.

De factuur is ook naar de aanvrager en de verantwoordelijke onderzoeker verstuurd.

De factuur wordt automatisch gegenereerd met de gegevens van de aanvrager.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.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.

[REDACTED]

---

**Van:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht <info@ivd-utrecht.nl>  
**Verzonden:** donderdag 7 mei 2015 11:42  
**Aan:** ZBO-CCD; Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
**CC:** [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** RE: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111  
**Bijlagen:** Ondertekend aanvraagformulier [REDACTED].pdf;  
aanvraagformulier\_projectvergunning\_dierproeven\_1 - UMCU-3-1-3 update.pdf

Geachte mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van uw e-mail kan ik u als volgt antwoorden

Ad 1. Het ondertekende aanvraagformulier is een aantal dagen geleden per post verzonden. Bijgaand vind u een gescande versie van het ondertekende en gedateerde formulier.

Ad 2. Per abuis meldt u dat in het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is. Er is op het formulier echter niet aangegeven, dat er een gemachtigde is en dus ook niet dat er een bijbehorende bijlage meegestuurd zou worden.

Ad 3. De vermelde aanvangsdatum is inderdaad achterhaald. [REDACTED] heeft aangegeven, dat de startdatum nu op **1-7-2015** is gesteld en de einddatum op **1-7-2017** (zie de aangepaste data in de 2<sup>e</sup> bijlage).

Ik hoop u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,  
[REDACTED]

[REDACTED] • Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht • Bolognalaan 50 • kamer [REDACTED] • 3584 CJ Utrecht •  
[www.ivd-utrecht.nl](http://www.ivd-utrecht.nl) • [REDACTED]@uu.nl • +31 (0)30 [REDACTED] • 06 [REDACTED]

Gebruik [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) voor algemene vragen.



---

**From:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Sent:** woensdag 6 mei 2015 16:38  
**To:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
**Cc:** [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Subject:** t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben we een aanvraag voor een projectvergunning van UMC ontvangen met de titel "The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs", met aanvraagnummer AVD115002015111.

In de brief die u mee hebt gestuurd vraagt u om verdere correspondentie gerelateerd aan deze aanvraag aan de IvD Utrecht te verzenden. Dus stellen we u de volgende vragen.

1) In de brief meldt u dat het ondertekende aanvraagformulier wordt per post verstuurd. Tot nu toe hebben we geen formulier per post ontvangen, dus willen we graag weten of het formulier al verstuurd is en wanneer kunnen we het verwachten.

2) In het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is, maar u heeft geen machtiging mee gestuurd. Komt die ook ondertekend per post? Wij hebben de machtiging en de gegevens van de gemachtigde nodig.

3) Op het aanvraagformulier en de NTS staat 1-04-2015 als begindatum van het project. Omdat de begindatum niet in de verleden kan zijn, willen we u vriendelijk vragen om de begindatum en einddatum, indien van toepassing, te veranderen en aan ons schriftelijk bekend te maken via een email, of een aangepaste digitale versie van het aanvraagformulier en NTS. Een project kan niet worden opgestart vóór dat de vergunning verleend is.

We hopen snel een reactie van uw te mogen ontvangen.

Pas als de aanvraag compleet is kunnen we haar verder in behandeling nemen; het betekent ook dat de klok stil staat.

Mocht u nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

  
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.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.

[REDACTED]

---

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** donderdag 7 mei 2015 12:52  
**Aan:** 'Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht'  
**Onderwerp:** RE: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer [REDACTED]

Hartelijk bedankt voor uw snelle reactie.

Vanochtend is het aanvraagformulier met de natte handtekening binnengekomen.

Met betrekking tot de gemachtigde: in de digitale versie van het aanvraagformulier dat wij samen met de andere documenten op 30 april hebben ontvangen staat "Ja" aangekruist bij de vraag of er een gemachtigde is, maar het kan zijn dat door het feit dat er de invulbare pdf was, heeft iemand per ongeluk verkeerd ingedrukt later in het proces. In ieder geval, dank u voor het verduidelijken.

Met vriendelijk groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

---

**Van:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht [mailto:info@ivd-utrecht.nl]

**Verzonden:** donderdag 7 mei 2015 11:42

**Aan:** ZBO-CCD; Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
[REDACTED]@umcutrecht.nl

**Onderwerp:** RE: t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van uw e-mail kan ik u als volgt antwoorden

Ad 1. Het ondertekende aanvraagformulier is een aantal dagen geleden per post verzonden. Bijgaand vindt u een gescande versie van het ondertekende en gedateerde formulier.

Ad 2. Per abuis meldt u dat in het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is. Er is op het formulier echter níet aangegeven, dat er een gemachtigde is en dus ook niet dat er een bijbehorende bijlage meegestuurd zou worden.

Ad 3. De vermelde aanvangsdatum is inderdaad achterhaald. [REDACTED] heeft aangegeven, dat de startdatum nu op **1-7-2015** is gesteld en de einddatum op **1-7-2017** (zie de aangepaste data in de 2<sup>e</sup> bijlage).

Ik hoop u op deze wijze voldoende geïnformeerd te hebben.

Met vriendelijke groet,

Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht • Bolognalaan 50 • kamer 3584 CJ Utrecht •  
[www.ivd-utrecht.nl](http://www.ivd-utrecht.nl) • +31 (0)30 9 06

Gebruik [info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) voor algemene vragen.



---

**From:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Sent:** woensdag 6 mei 2015 16:38  
**To:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
**Cc:** @umcutrecht.nl  
**Subject:** t.a.v. dhr. betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer

Op 30 april 2015 hebben we een aanvraag voor een projectvergunning van UMC ontvangen met de titel "The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs", met aanvraagnummer AVD115002015111.

In de brief die u mee hebt gestuurd vraagt u om verdere correspondentie gerelateerd aan deze aanvraag aan de IvD Utrecht te verzenden. Dus stellen we u de volgende vragen.

1) In de brief meldt u dat het ondertekende aanvraagformulier wordt per post verstuurd. Tot nu toe hebben we geen formulier per post ontvangen, dus willen we graag weten of het formulier al verstuurd is en wanneer kunnen we het verwachten.

2) In het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is, maar u heeft geen machtiging mee gestuurd. Komt die ook ondertekend per post? Wij hebben de machtiging en de gegevens van de gemachtigde nodig.

3) Op het aanvraagformulier en de NTS staat 1-04-2015 als begindatum van het project. Omdat de begindatum niet in de verleden kan zijn, willen we u vriendelijk vragen om de begindatum en einddatum, indien van toepassing, te veranderen en aan ons schriftelijk bekend te maken via een email, of een aangepaste digitale versie van het aanvraagformulier en NTS. Een project kan niet worden opgestart vóór dat de vergunning verleend is.

We hopen snel een reactie van uw te mogen ontvangen.

Pas als de aanvraag compleet is kunnen we haar verder in behandeling nemen; het betekent ook dat de klok stil staat.

Mocht u nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.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.



**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** vrijdag 12 juni 2015 10:39  
**Aan:** 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** Terugkoppeling beslissing aanvraag AVD115002015111 (uw referentie 2015.II.115.002)

Geachte heer/mevrouw,

Op 28 april 2015 heeft de DEC Utrecht advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project "The role of osteogenic growth factors in bone replacement constructs", uw kenmerk: 2015.II.115.002. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft nog een vraag aan de aanvrager gesteld:

"In uw aanvraag geeft u aan gebruik te maken van zowel konijnen als ratten. Voor konijnen gaat u zowel mannelijke als vrouwelijk dieren gebruiken, terwijl voor ratten alleen mannelijke dieren gebruikt gaan worden. De onderbouwing voor de keuze om alleen mannelijke ratten te gebruiken ontbreekt. De commissie zou graag een goed onderbouwde motivering voor uw keuze willen ontvangen."

De aanvrager heeft een goed onderbouwd en overtuigend antwoord gegeven.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)

[REDACTED]

---

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** woensdag 6 mei 2015 16:38  
**Aan:** info@ivd-utrecht.nl  
**CC:** [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** t.a.v. dhr. [REDACTED] betreft aanvraag projectvergunning AVD115002015111

Geachte heer [REDACTED]

Op 30 april 2015 hebben we een aanvraag voor een projectvergunning van UMC ontvangen met de titel "The role of osteogenic (growth) factors in bone replacement constructs", met aanvraagnummer AVD115002015111.

In de brief die u mee hebt gestuurd vraagt u om verdere correspondentie gerelateerd aan deze aanvraag aan de IvD Utrecht te verzenden. Dus stellen we u de volgende vragen.

- 1) In de brief meldt u dat het ondertekende aanvraagformulier wordt per post verstuurd. Tot nu toe hebben we geen formulier per post ontvangen, dus willen we graag weten of het formulier al verstuurd is en wanneer kunnen we het verwachten.
- 2) In het digitale aanvraagformulier is vermeld dat er een gemachtigde is, maar u heeft geen machtiging mee gestuurd. Komt die ook ondertekend per post? Wij hebben de machtiging en de gegevens van de gemachtigde nodig.
- 3) Op het aanvraagformulier en de NTS staat 1-04-2015 als begindatum van het project. Omdat de begindatum niet in de verleden kan zijn, willen we u vriendelijk vragen om de begindatum en einddatum, indien van toepassing, te veranderen en aan ons schriftelijk bekend te maken via een email, of een aangepaste digitale versie van het aanvraagformulier en NTS. Een project kan niet worden opgestart vóór dat de vergunning verleend is.

We hopen snel een reactie van uw te mogen ontvangen.

Pas als de aanvraag compleet is kunnen we haar verder in behandeling nemen; het betekent ook dat de klok stil staat.

Mocht u nog vragen hebben, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

Centrale Commissie Dierproeven [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

T: 0900 2800028

E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)