



## 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.

Voedselinname is een belangrijk onderdeel van de dagelijkse routine van meeste levende organismen; mensen en dieren moeten voldoende voedingsstoffen binnen krijgen om te kunnen overleven. We weten dat tal van interne en externe factoren invloed hebben op gedrag omtrent voedsel. Deze factoren variëren van mond-, maag- en darmregulatoren (smaak, fysieke rek van het maag-darmstelsel) tot voedingshormonen (leptine, ghreline, insuline), emoties en motivationale processen. Er is slechts beperkte kennis over hoe al deze factoren exact aangrijpen op de neuronale verbindingen die uiteindelijk voedselinname bepalen.

Bij voedselinname zijn twee processen binnen het brein van groot belang: homeostatische voeding, dat is het op pijl houden van de energiebalans van het lichaam, en het werkelijke voedselkeuzeproces [Rangel (2013), *Nature Neuroscience* 16(12): 1717-24]. De consensus binnen de wetenschappelijke wereld is dat deze twee processen worden verwerkt binnen verschillende gebieden in het brein: bij de homeostase zijn met name de (laterale) hypothalamus en hersenstamcentra van belang, terwijl bij het keuzeproces met name de frontale hersengebieden en het striatum betrokken zijn. Deze twee circuits zijn niet of slechts in beperkte mate met elkaar verbonden; het is dus zeer waarschijnlijk dat andere hersengebieden een 'brug' vormen tussen de homeostatische en keuzecircuits binnen het brein. Een potentiële speler op dit vlak is het ventrale tegmentale gebied (VTA), dat door middel van de neurotransmitter dopamine onder andere betrokken is bij belonend gedrag. Dit gebied is vermoedelijk belangrijk, omdat voedsel gezien wordt als een natuurlijke beloning [Volkow (2011), *Trends in Cog Sciences* 15(1): 37-46], en omdat de VTA sterk verbonden is met zowel hypothalamus als prefrontale cortex. De meeste kennis is beschikbaar over de homeostatische aspecten van voedselinname [zie voor recente ontwikkelingen Lee and Blackshaw (2014), *Annu. Rev. Psychology* 76: 197-233]. Het keuzeaspect van voeding is echter van minstens zo een groot belang, maar is minder gedetailleerd onderzocht. Vermoed wordt dat bij het maken van een keuze, het brein keuzeropties opdeelt in zogenaamde 'determinanten'. Zo wordt de keuze voor een voedingsmiddel opgedeeld in determinanten zoals caloriewaarde, smaak, prijs, maar ook eventuele gevolgen voor de gezondheid. Deze aspecten van keuze worden in het brein los berekend, en op een zeker punt geïntegreerd zodat een afgewogen keuze kan worden gemaakt op basis van een vergelijking van subjectieve waardes van de verschillende opties [Zie voor een uitgebreide review Padoa-Schioppa (2011), *Ann Rev Neurosci* 34: 333-359]. De meeste kennis over de neuronale basis van keuze is opgedaan uit lesiestudies, waarbij met een elektrische stroom of toxische stof een deel van het brein wordt beschadigd, om zo te onderzoeken wat de bijdrage van dat hersengebied is in (voedsel)keuze. Zo weten we dat de orbitofrontale cortex betrokken is bij flexibiliteit van keuze door een rol in het toekennen van waarden aan keuzeropties [Stalnaker et al. (2015), *Nat Neurosci* 18(5):620-626]. Andere lesiestudies hebben aangetoond dat de amygdala en het striatum belangrijke hersengebieden zijn voor de Pavloviaanse controle over keuze (i.e. de vorming van associaties tussen voedselgerelateerde cues en gedrag, zoals aantrekkingskracht tot een fastfoodbord langs de snelweg) [Ostlund & Balleine (2007), *J Neurosci* 27: 4819-4825].

[REDACTED]. Op dit gebied is de laatste tijd veel vooruitgang geboekt; zo zijn er enkele nieuwe neuronale verbindingen ontdekt die betrokken lijken te zijn bij compulsieve suikerinnname [e.g. laterale hypothalamus-VTA, Nieh et al. (2015), Cell 160(3): 528-541]. Van veel verbindingen is echter nog niet bekend hoe het voedselkeuze exact beïnvloedt, en op dit vlak is er dan ook nog veel werk te verrichten.

Uiteindelijk hopen we door het onderzoek kennis te kunnen leveren aan de neuronale basis voor voedselkeuze, om zodoende aangrijppunten voor de behandeling van eetstoornissen te vinden. Tot dusverre is het bijvoorbeeld niet duidelijk waarom sommige individuen makkelijker vet voedsel kunnen laten staan dan anderen, of waarom dieten slechts bij sommige mensen aanslaan. Met meer fundamentele kennis over voedselkeuze kunnen behandelingen gericht en daarmee effectiever worden. Hierin is dierexperimenteel onderzoek essentieel; alleen op deze manier kan onderzocht worden wat de causale rol is van celgroepen en cellulaire verbindingen op gedrag.

---

### 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 doel van het project is kennis vergaren over de neuronale basis van voedselkeuze. Specifiek willen we nieuwe neuronale projecties vinden of bestaande neuronale projecties verder onderzoeken die van invloed zijn op aspecten van voedselkeuzegedrag, bijvoorbeeld de voorkeur voor caloriehoudend voedsel. Van ieder van deze neuronale projecties willen we verschillende aspecten onderzoeken:

- Wat is het belang van deze verbinding in voedselkeuzegedrag? (gedekt door deel A van dit onderzoek; zie 3.4.2)
- Hoe communiceert dit neuronale circuit met andere hersengebieden? (gedekt door deel B van dit onderzoek; zie 3.4.2)
- Hoe ziet neuronale activiteit in dit hersengebied er uit tijdens gedragstaken omtrent voedselkeuze? (gedekt door deel C van dit onderzoek; zie 3.4.2)

[REDACTED]

Enkele key publications van het lab:

- Meye et al. (2013), Molecular Psychiatry 18: 1294-1301
- Boender et al. (2014), PLoS One 9(4):e95392
- Adan (2013), Trends Neuroscience 36(2): 133-40

---

### 3.3 Belang

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

Voedselkeuze is een erg relevant onderwerp; vrijwel elke diersoort (inclusief de mens) heeft er dagelijks mee te maken. Toch ontbreekt er op het moment wetenschappelijke kennis over de primaire neuronale mechanismen die ten grondslag liggen aan het voedselkeuzep proces. Hoe wordt bijvoorbeeld de keuze voor caloriehoudend voedsel gemaakt? En hoe grijpt informatie over de energiehuishouding van het lichaam hierop aan? Waar wordt informatie over smaak geïntegreerd met de behoefte aan bepaalde voedingsstoffen? En hoe worden negatieve consequenties (zoals negatieve gezondheidsgevolgen) van de inname van calorierijk voedsel gecodeerd in het brein?

Dit zijn vragen waar op het moment nog geen antwoord op gegeven kan worden. Als we deze wel willen beantwoorden is fundamentele kennis over de

neurale mechanismen van voedselkeuze nodig. Dit zal een belangrijke stap zijn in het ontrafelen van het brein en daarmee menselijk gedrag.

Ook het klinisch belang is groot - het veranderde aanbod van voedsels in de afgelopen decennia, en de daaruit voortkomende verandering in voedselkeuze speelt een belangrijke rol bij de voortschrijdende obesitasepidemie [Hill and Peters (1998), Science 280: 1371-1374]. Hierbij zijn van belang de overvloedige aanwezigheid van voedsel en voedselgerelateerde cues (e.g. reclame), maar ook de veranderde compositie van het voedsel. Zo worden steeds meer voedingsmiddelen geconsumeerd die hoog zijn in koolhydraten. Deze producten geven slechts een beperkt verzadigd gevoel (door de afwezigheid van vezels), zonder daarbij te voorzien in alle lichaamsbehoeften (e.g. proteïnen). Zolang er geen wetenschappelijke kennis is over de neuronale basis van voedselkeuze, zullen behandelingen van obesitas eerder gericht zijn op symptoombestrijding dan op het aanpakken van de oorzaak. Het maatschappelijk belang voor het aanpakken van obesitas is enorm: op het moment heeft 47% van de Nederlanders overgewicht en is 12% van de mensen obees - aantallen die alleen maar blijven toenemen [CBS, 2013]. De gevolgen van obesitas voor iemands gezondheid zijn desastreus, en variëren van diabetes mellitus type II tot een verhoogde kans op kanker en cardiovasculaire aandoeningen (hartfalen).

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

In het project zal gekeken worden naar hersengebieden en -verbindingen die betrokken zijn bij voedselkeuze, [redacted]. Bij het ontleden van deze verbindingen en het onderzoeken van hun functionaliteit, zullen de volgende drie strategieën worden gebruikt in ratten en muizen:

[redacted]

De keuze voor een bepaald soort neuronale projectie zal gedaan worden op basis van literatuur en (deels reeds uitgevoerde) anatomische studies.

(deel A)

We willen beginnen met het in kaart brengen van functionele connecties in deze gebieden en het manipuleren van neuronale circuits in het netwerk [redacted] middel van optogenetica en farmacogenetica.

[redacted]

[redacted] Door deze manipulatie toe te passen tijdens een voedselkeuzetaak, [redacted]. Deze modulatie van neurale activiteit zullen wij op specifieke momenten tijdens de taak doen zodat wij nauwkeurig kunnen bestuderen hoe veranderde hersenactiviteit het gedrag beïnvloedt. [redacted]

[redacted]

In de gedragstaak zal een dier telkens de keuze krijgen tussen twee verschillende voedingsstoffen in verschillende hoeveelheden. [redacted]



[REDACTED]

Door dieren vooraf op een voedselbeperkt dieet te zetten kunnen we de motivatie beïnvloeden. Verder zijn we geïnteresseerd om de gemoedstoestand van dieren te beïnvloeden en te bestuderen hoe dat het uitvoeren van de keuzetaak beïnvloedt. De gemoedstoestand zal worden beïnvloed door het afspelen van een geluid dat het dier associeert met aversieve gevoelens; zo'n associatie kan gemaakt worden door het dier vóór het experiment een voetschok te geven en tegelijkertijd deze toon te laten horen.

[REDACTED]

(deel B)

Naast de voedselkeuzetaak zal door middel van in vitro elektrofysiologie worden onderzocht wat de elektrochemische eigenschappen [REDACTED]. Als een bepaalde neuronale verbinding relevant is gebleken voor voedselkeuzegedrag is het van belang uit te zoeken wat de exacte rol is van deze neuronale verbinding in zijn omgeving. Zo kan worden onderzocht welke neurotransmitter die specifieke neuronale verbinding gebruikt om te communiceren, met welke andere hersengebieden het is verbonden, en wat de sterkte is van die verbinding. Deze kennis is nodig om de exacte rol van de te onderzoeken neuronale verbindingen in het brein te bepalen.

(deel C)

Tot slot wordt met in vivo metingen gekeken wat de cellen binnen het netwerk doen tijdens het uitvoeren van de keuzetaak. [REDACTED]

[REDACTED]

---

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

[REDACTED]

Te beantwoorden vraag: Wat is het belang van deze verbinding in voedselkeuzegedrag?

Deel B: in vitro elektrofysiologie [REDACTED]

Diersoort: Wistar ratten, TH::Cre ratten (om specifiek dopaminecellen te targetten), C57/Bl6 muizen, verschillende muis Cre-lijnen (zo veel mogelijk surplus)

Doel: Het in kaart brengen van functionele circuits [REDACTED]

Te beantwoorden vraag: hoe communiceert dit neuronale circuit met andere hersengebieden?

Deel C: in vivo elektrofysiologie [REDACTED]

Diersoort: Wistar ratten, TH:Cre ratten, C57/Bl6 muizen, verschillende muis Cre-lijnen

Doel: Het aflezen van neuronale activiteit tijdens de gedragstaak uit deel A

Te beantwoorden vraag: Hoe ziet neuronale activiteit in dit hersencircuit eruit tijdens een gedragstaak omtrent voedselkeuze?

---

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

---

De verschillende onderdelen (A, B en C) kunnen ten dele parallel worden uitgevoerd.

De onderdelen vallen allemaal binnen het project omdat ze noodzakelijk zijn voor het ontleden van een neuronaal circuit. Hierin is het van belang om eerst de anatomie in kaart te brengen (gedeeltjke eerder uitgevoerd op een andere DEC aanvraag), hierna de functionaliteit van dit netwerk te bepalen (gedekt door de in vitro en in vivo elektrofysiologie) en de invloed van dit netwerk op gedrag te bepalen [REDACTED]

[REDACTED]

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	manipulatie van voedselkeuze
2	In vitro elektrofysiologie
3	In vivo elektrofysiologie
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht  
Prof. dr. F. Miedema  
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  
AVD115002015119  
**Bijlagen**  
2

Datum 20-05-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],  
Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 mei 2015.  
Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002015119. 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:

[REDACTED]

KvK-nummer:

30244197

Postbus:

[REDACTED]

Postcode en plaats:

[REDACTED] UTRECHT

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer:

Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Afdeling:

[REDACTED]

Telefoonnummer:

[REDACTED]

E-mailadres:

[REDACTED]

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 mei 2015  
Geplande einddatum: 30 april 2020  
Titel project: Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze  
Titel niet-technische samenvatting: Hersenverbindingen die betrokken zijn bij voedselkeuze

**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  
 Brief en factuur

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Utrecht  
Datum: 13 mei 2015



> 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  
AVD115002015119

**Bijlagen**

2

Datum 20-05-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 20 mei 2015

Vervaldatum: 19 juni 2015

Factuurnummer: 201570119

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015119	€ 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.



**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.I.527.006
2. Titel van het project : Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze
3. Titel van de NTS : Hersenverbindingen die betrokken zijn bij voedselkeuze

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – [REDACTED]  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

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

- ontvangen door DEC: 2-4-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 8-4-2015  
 anderszins behandeld: per email: 20-04-2015 en 30-04-2015  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-04-2015 tot 17-04-2015 en 30-04-2015  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 13-05-2015

## 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: 14-04-2015 en 30-04-2015
- Strekking van de vraag / vragen: Vragen mb.t. de NTS op 14-04-2015:
  - 3.4 Verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: De DEC verzoekt u het woord proefjes te vervangen door experimenten. Graag aanpassen.
  - 4.1 Vervanging: De DEC verzoekt u het woord translationeel te vervangen door een voor de leek makkelijker te begrijpen woord of omschrijving. Graag aanpassen.

- De DEC verzoekt u in de gehele NTS en het gehele projectvoorstel een duidelijk onderscheid te maken tussen voedselkeuze en (de mate van) voedselinname en deze termen niet te gebruiken alsof ze onderling uitwisselbaar zijn. Gezien het feit dat uw onderzoek zich richt op voedselkeuze (zie projectformulier vraag 3.2, doelstelling), kunt u ook overwegen om de stukken die betrekking hebben op voedselinname in zijn geheel te verwijderen. Dit wekt namelijk vooral verwarring.

Vragen m.b.t. het projectvoorstel op 14-04-2015:

- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u in de achtergrond eerst een wat breder beeld te schetsen van het onderzoeksveld en u daarna pas te richten op de focus van uw onderzoek en de keuze voor die focus te motiveren. Graag aanpassen.
- 3.1, achtergrond: De DEC vraagt zich af waarom u in een onderzoek dat zich richt op voedselkeuze zo nadrukkelijk naar obesitas en anorexia nervosa verwijst. Dat zijn pathologieën die eerder te maken hebben met voedselopname dan met voedselkeuze. U slaagt er naar het oordeel van de DEC niet in om duidelijk te maken wat voedselkeuze (dus: welk voedsel) te maken heeft met voedselinname (dus: hoeveelheid voedsel) en langs welke weg voedselkeuze uiteindelijk zou leiden tot problemen als obesitas en anorexia nervosa. Dit behoeft verduidelijking.
- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u de achtergrond meer te schrijven in het kader van fundamenteel onderzoek, in plaats van op toepassing, omdat dit niet de focus is van uw onderzoek. De DEC geeft u als suggestie mee om de achtergrond te schrijven vanuit uw beschreven doelstelling (zie uw antwoord op vraag 3.2).
- 3.3, belang: U zet obesitas en anorexia nervosa naast elkaar alsof dit twee verschijningsvormen van hetzelfde onderliggende probleem zijn. De commissie vindt dat wat kort door de bocht. Graag toelichten en anders verwoorden (of weglaten indien het niet van belang is voor wat u in dit project wilt doen).
- 3.3, belang, begin 2e alinea: U stelt eerst dat obesitas en anorexia nervosa eetstoornissen zijn die voortkomen uit voedselkeuze en kort daarna in dezelfde zin dat obesitas gelijk staat aan "overconsumptie". Ook hier haalt u voedselkeuze en (de mate van) voedselinname door elkaar. Dit roept vragen op over de focus van uw onderzoek.
- 3.3, belang: De DEC verzoekt u het belang minder stellig te verwoorden, omdat het gaat om fundamenteel onderzoek, waarbij de toepassing ver verwijderd is. De suggestie dat de inzichten die dit onderzoek oplevert bij zullen dragen aan het vinden van oplossingen voor obesitas en anorexia nervosa is erg speculatief. Het gaat hier voorlopig om niet meer dan de neuronale basis van voedselkeuze. Graag nuanceren.
- 3.3, belang: U schrijft dat anorexia nervosa een dodelijke ziekte is. Dit is echter niet correct, graag verwijderen.
- 3.4, onderzoeksstrategie, 3.4.1: Het is niet duidelijk in hoeverre deel B betrekking heeft op de vraagstelling. Dit deel lijkt meer te maken te hebben met voedselinname. Graag verhelderen.

Bijlage 1:

- De dieren: De reactie op het commentaar van de IvD over het gebruik van de Wistar-rat en mannelijke dieren is niet adequaat. Graag aanpassen. Zo nodig nogmaals met de IvD overleggen, de argumentatie is namelijk niet correct.

Vragen m.b.t. de NTS op 30-04-2015:

- Onder 3.1 van de NTS legt u wederom de nadruk op eetstoornissen, vaak resulterend in obesitas. Maar de focus van het onderzoek ligt op voedselkeuzegedrag en de onderliggende neuronale circuits en hersengebieden. Dat komt hier onvoldoende uit de verf. NTS graag nogmaals hierop aanpassen.

Vragen m.b.t. het projectvoorstel op 30-04-2015:

- Onder 3.1 van de projectbeschrijving vermeldt u dat over neuronale mechanismen achter voedselinname veel bekend is, in tegenstelling tot de neuronale mechanismen achter voedselkeuzegedrag. Dat weinige dat dan kennelijk bekend is had de DEC graag hier weergegeven gezien en hoe het nu voorgestelde onderzoek daar op aansluit. Graag nog opnemen in de aanvraag.

- Datum antwoord: 17-04-2015 en 30-04-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en): Antwoorden m.b.t. de NTS op 17-04-2015:
  - De eerste twee opmerkingen van de DEC zijn aangepast in de NTS.
  - De onderzoeker begrijpt de verwarring. Hij zal de verwijzingen naar (de mate van) voedselinname waar mogelijk verwijderen of vervangen.

Antwoorden m.b.t. het projectvoorstel op 17-04-2015:

- Verwijzingen naar obesitas in de inleiding zijn verwijderd. Het geheel is wat aangepast; het begint nu met wat de onderzoekers weten over voedselinname, en voedselinname in de tweede alinea is opgesplitst in 1) homeostatische voeding en 2) voedselkeuze. Hierna ligt de focus alleen op voedselkeuze. De opbouw is nu logischer.
- Het hele onderdeel 'Belang' (3.3) is herschreven. Het stuk begint nu met het onderschrijven van het nut van fundamentele kennis over voedselkeuze, en richt zich daarna kort op obesitas. Ook is de link tussen voedselkeuze en obesitas verduidelijkt (dit gaat met name om de toegenomen inname van koolhydraathoudend voedsel in onze maatschappij). De onderzoeker deelt de mening van de DEC dat de link met anorexia nervosa niet overtuigend is. Deze verwijzing is derhalve weggehaald.
- De onderzoeker onderkent de verwarring; het genoemde voorbeeld met leptine was niet erg treffend. Dit is nu algemener beschreven.
- In overleg met de IvD is een deel van de tekst gewijzigd.

Antwoord m.b.t. de NTS op 30-04-2015:

- Deel 3.1 is herschreven. De focus ligt nu meer op de neuronale basis en minder op eetstoornissen.

Antwoord m.b.t. het project voorstel op 30-04-2015:

- De onderzoeker heeft een stuk toegevoegd over wat tot nu toe bekend is over voedselkeuzegedrag, en aangegeven wat het voorliggende projectvoorstel aanvult op eerder uitgevoerd onderzoek: de kennis over voedselkeuze is in het verleden hoofdzakelijk opgebouwd met behulp van nogal primitieve lesie-experimenten, maar de geavanceerde technieken die nu voorgesteld worden zullen tot meer resultaat leiden.

- 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 / is in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en).

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang, omdat het onderzoek kan bijdragen aan het vergroten van kennis over de neuronale basis van voedselkeuze. Meer in het bijzonder is het onderzoek gericht op het vinden van nieuwe neuronale projecties of het onderzoeken van bestaande neuronale projecties die van

invloed zijn op aspecten van voedselkeuzegedrag, bijvoorbeeld de voorkeur voor calorierhoudend voedsel, met als uiteindelijk doel het vinden van handvatten die kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van behandelingen die ongezond eetgedrag kunnen tegen gaan.

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.

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 voor 80% van de dieren ingeschat als matig en voor 20% van de dieren als licht of terminaal. De DEC is van mening dat dit realistische inschattingen zijn; het merendeel van de dieren ondergaan 1 à 2 keer een lichte ingreep onder anesthesie, worden regelmatig geïnjecteerd, krijgen een operante conditioneringstaak aangeleerd, krijgen incidenteel lichte voetschokken toegediend, worden op (beperkte) voedselrestrictie gezet en indien nodig individueel gehuisvest. De onderzoeker heeft ruime ervaring met [REDACTED] technieken zoals [REDACTED] en met in vitro en in vivo elektrofysiologie. Minder ervaring is er met fotometrie, maar de DEC acht dit niet bezwaarlijk, omdat het niet waarschijnlijk is dat dit tot extra ongerief voor de dieren zal leiden.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Omdat onderzoek wordt gedaan naar gedrag, is het niet mogelijk om proefdierlijke alternatieven te gebruiken. Hersenmechanismen en gedrag zijn te complex om met de huidige proefdierlijke technieken na te bootsen. In proefdieren is het mogelijk gedrag te begrijpen op het niveau van de cel, waarbij cellen onderzocht en gemanipuleerd kunnen worden. Vooralsnog is het niet mogelijk om dergelijk proeven humaan uit te voeren.

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. 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 opzicht van de gekozen strategie en looptijd. Daarnaast houdt de onderzoeker continu in de gaten hoe ver het onderzoek al gevorderd is en of de doelstellingen al zijn bereikt. Als dit het geval is, kan worden volstaan met minder dan het aangevraagd aantal dieren.

9. De DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven en het project is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is gekozen voor het meest geschikte diermodel: de geavanceerde methodologie maakt het mogelijk zeer gericht te meten en in te grijpen in hersenverbindingen. Hiervoor worden muisstammen met zeer specifieke genetische veranderingen gebruikt. Ratten worden gebruikt voor de meer complexe gedragstaken omdat zij beter in staat zijn gedragstaken aan te leren dan muizen. Verder vindt er adequate pijnbestrijding en anesthesie plaats en zijn heldere humane eindpunten geformuleerd. 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**

Het onderzoek in deze projectaanvraag is in de eerste plaats fundamenteel wetenschappelijk van aard. Het richt zich op de vraag welke neuronale verbindingen en processen betrokken zijn bij het ontstaan van een voorkeur voor vet- en suikerrijk voedsel met een hoge calorische waarde. In het licht van de toenemende incidentie van obesitas, is dat fundamentele kennis die van belang is, omdat aangenomen wordt dat overgewicht niet simpelweg veroorzaakt wordt door te veel eten, maar ook door de keuze voor voeding met veel calorieën, die maar een beperkt verzadigd gevoel geeft. Het vergroten van de kennis over de neuronale basis van voedselkeuze is van substantieel belang.

Tegenover dit belang staat dat door de diverse handelingen (1 à 2 x anesthesie, meerdere injecties, (beperkte) voedselrestrictie, eventueel solitaire huisvesting, etc.) voor een groot deel van de dieren matig ongerief ontstaat, 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 of ex vivo alternatieven beschikbaar.

Naar aanleiding van dit onderzoek zou de vraag gesteld kunnen worden of het aanvaardbaar is om dierproeven te doen voor onderzoek naar "aandoeningen" en gezondheidsrisico's waaraan mensen zich zelf blootstellen. De term voedselkeuze impliceert immers dat er sprake is van een "keuze" en dus ook dat mensen ervoor kunnen kiezen niet te veel te eten en bepaald voedsel niet te eten, waardoor obesitas uitblijft.

Deze problematiek is buitengewoon ingewikkeld, onder andere omdat niet goed duidelijk is in hoeverre er eigenlijk sprake is van een vrije keuze. Ten eerste veronderstelt een echt vrije keuze voor gezond voedsel dat degene die de keuze moet maken over voldoende kennis beschikt en bij het maken van die keuze geen druk ervaart en niet zonder het zelf te beseffen beïnvloed wordt. Er is vaak op gewezen dat in onze samenleving goedkoop vet- en suikerrijk voedsel in overvloed aanwezig is. Gebrek aan kennis, reclame uitingen, tijdgebrek, sociale druk, het gevoel van "beloning" dat iemand ervaart bij het eten van bijvoorbeeld suikerrijk voedsel en nog tal van andere factoren kunnen eenvoudig leiden tot ongezond eetgedrag. Dat is zeker het geval als men verkeert in een omgeving waarin vrijwel iedereen daaraan meedoet. Ten tweede is het onmiskenbaar zo dat het voor personen die al overgewicht hebben, erg moeilijk is om het aangeleerde ongezonde eetgedrag weer af te leren. Wanneer iemand veel alcohol drinkt, dan is de gedachte dat het om een verslaving gaat algemeen geaccepteerd. Ook ongezond eetgedrag vertoont kenmerken van verslaving. Het is in de ogen van de commissie dan ook te eenvoudig om eenzijdig de nadruk te leggen op de eigen verantwoordelijkheid van mensen met overgewicht. Daarmee is overigens niet gezegd dat het probleem puur langs farmacologische weg op te lossen zou zijn (of dat dat wenselijk zou zijn). Ook voorlichting en het aanpakken van de inrichting van de samenleving die ongezond eetgedrag in de hand werkt, is van belang. Maar fundamentele kennis over voedselkeuzegedrag, die op den duur mensen handvatten kan bieden om hun eigen eetgedrag weer in de hand te krijgen, is wel degelijk waardevol als onderdeel van de mogelijke oplossing van dit probleem.

Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC dan ook unaniem van mening dat het belang van de doelstelling, namelijk kennis vergaren over de neuronale basis van voedselkeuze, substantieel is en opweegt tegen het lichte tot matige ongerief dat de dieren in dit onderzoek zal ondervinden. 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.





## 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="1"/> | <input type="text" value="manipulatie van voedselkeuze"/> |

*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.

De experimenten die in dit protocol beschreven worden hebben tot doel om tijdens de uitvoering van een voedselkeuze taak bepaalde neurale projecties te inhiberen of te stimuleren.

zodat wij de nauwkeurig kunnen bestuderen hoe veranderde hersenactiviteit het gedrag beïnvloedt.

Door in de gedragstaak ratten de mogelijkheid te geven beloningen te verkrijgen die variëren in energiewaarde (aantal calorieën) of in smaak (lekker/minder lekker), kunnen wij bepalen of bepaalde informatie tussen de bepalend is voor voedselkeuze.

Bij sommige dieren willen we een transmitter inplanteren in de buik om zo lichaamstemperatuur te monitoren. Dit kan interessant zijn om de metabole staat van het dier te bepalen (i.e. verhoogde verbranding).

Primaire uitkomstmaten: voorkeur voor voedsels van verschillende samenstellingen (calorieën en smaak), snelheid van respons (pedaaldrukken of nosepokes) tijdens de operante taak, het lik-/eetgedrag van de dieren.

Van al deze primaire uitkomstmaten kijken we hoe deze wordt beïnvloed door energiebalans (wel of geen voedselrestrictie), hersenmanipulatie (celgroepen geactiveerd of geïnhibeerd), voedselhormonen (zoals leptine, ghreline, Gastrin-Like peptide) en neuronale a(NTA)gonisten (zoals dopamine agonisten).

Ter controle zullen we bij deze dieren enkele gestandaardiseerde testen uitvoeren om de invloed van de neuronale projectie op niet-voedsel specifiek gedrag te onderzoeken (om uit te sluiten dat het effect op voedselkeuze een andere onderliggende oorzaak heeft): o.a. vrij eetgedrag in een voedselweegsysteem, open field test (voor locomotie), elevated plus maze (voor anxiety), en operant place preference (beide voor de appetitieve effecten van stimulatie). Bij positieve (i.e. significante) resultaten in de gedragstesten zullen de dieren na het experiment voor max. 4 weken op een hoogwaardig vet/suiker dieet worden gezet, om zo te kijken of bepaalde primaire uitkomstparameters voorspellend kunnen zijn voor obesitas.

---

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.

- Trainen op de operante leertaak waarbij een voedselbeloning verkregen kan worden: dagelijks 6 weken
- Operaties: injectie met een AAV virus / om , of voor inplanteren transmitter
- Uitvoeren operante taak: dagelijks 16 weken
- Voedselrestrictie: max. 16 uur of 85-90% van het vrijvoer gewicht / om de invloed van energiebalans te bepalen en de dieren meer gemotiveerd te maken voor de voedseltaak; dagelijks maar zodanig dat het lichaamsgewicht niet meer dan 10% daalt t.o.v. groeicurve
- Injectie voedselhormonen: max. 10 keer (exclusief saline injecties om dieren te laten wennen aan injecteren)
- Euthanasie (i.p. injectie) gevolgd door perfusie en fixatie
- Individuele huisvesting indien noodzakelijk (na optogenetica operatie, bij meten voerinname in voedselweegsysteem of bij voedselrestrictie op basis van vrijvoer gewicht)
- Incidenteel: voetschokken, tijdens maximaal 20 sessies, dit om dieren bepaalde audiovisuele cues te laten associëren met aversieve gevoelens (om

zodoende de gemoedstoestand van het dier te manipuleren), of om de dieren een 'prijs' te laten bepalen voor een bepaalde voedselkeuze

---

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

Bij het bepalen van het aantal dieren gaan we zoveel mogelijk uit van reeds gepubliceerde onderzoeken en eerdere resultaten uit ons eigen lab. We hebben een lange ervaring met het gebruik van operante gedragstaken, en hebben gezien dat dit uitstekend gecombineerd kan worden [redacted]. Met behulp van gemiddelden en standaardafwijkingen van eerdere resultaten voeren we poweranalyses uit om de minimaal benodigde dieraantallen te berekenen.

Doordat we verschillende aspecten van keuzegedrag willen onderzoeken, is het moeilijk nu een poweranalyse te baseren op slechts één enkele parameter van keuzegedrag. Echter is onze ervaring dat bij gedragsexperimenten significante resultaten ( $p=0.05$ ) verkregen kunnen worden met een groepsgrootte van ~12 dieren [zie o.a. de Jong et al. (2015), *Neuropsychopharmacology* advanced online pub Mar 04; van Zessen et al. (2012), *Neuron* 73(6): 1184-1194] wanneer drie groepen worden vergeleken. Dit willen wij ook doen; een controlegroep, een groep met exciterende manipulatie [redacted],

Per projectie zullen we derhalve ~36 dieren gebruiken. Vanwege operaties (mogelijk uitval) en piloten van experimenten (om op basis van deze pilots een betere groepsschatting te kunnen doen) en het inwerken van werknemers vragen we 5% extra aan. Totaal komt dan op 38 dieren per projectie.

Op basis van ervaring vragen we in totaal ~1500 dieren aan (zie deel B hieronder) om zo maximaal ~26 projecties bij ratten, en nog eens maximaal ~13 projecties bij muizen te kunnen onderzoeken (gebaseerd op een groepsgrootte van 38 dieren). Deze projecties zullen gekozen worden op basis van literatuur, eerder uitgevoerde anatomische studies, en (gedurende de komende vijf jaar) op basis van tussentijdse onderzoeksresultaten.

---

## **B. De dieren**

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

1000 ratten (man)

~750 Wistar Crl:WU

~250 TH::Cre (eigen fok)

500 muizen (man)

~200 WT dieren (C57/Bl6)



leeftijd. Hierbij maken we juist gebruik van de individuele verschillen tussen dieren, door te kijken naar of de verschillen in gedrag voorspellend kunnen zijn voor obesitas.

- We gebruiken uitsluitend mannelijke dieren omdat de invloed van de hormooncyclus op voeding aanzienlijk is, hetgeen kan leiden tot intraindividuele variatie. Bovendien zijn onze eerdere resultaten allemaal verkregen uit mannelijke dieren, en in het kader van replicatie is het daarom van belang om weer mannen te gebruiken.
- Doordat [REDACTED], is het mogelijk om meerdere metingen te doen in één dier, en kan elk dier als zijn eigen controle dienen. Dit vermindert het totaal aantal dieren.

Verfijning:

- Dieren worden zoveel mogelijk in groepen gehuisvest
- Dieren hebben kooiverrijking
- Er wordt perioperatieve pijnbestrijding toegepast
- Adequate anesthesie wordt toegepast
- We gebruiken zeer geavanceerde methoden waardoor veel informatie uit een dier wordt verzameld en gecorreleerd kan worden
- Warmtematjes tijdens en na operatie
- Fysiologisch zout na operatie

Vervanging:

- Omdat we kijken naar gedrag, zijn er geen alternatieve (in vitro) methoden.
- Humaan onderzoek is geen afdoende vervanging, omdat het daarbij niet mogelijk is invasieve methodes op het niveau van de cel toe te passen. Wil men een werkelijk causale relatie aantonen tussen bepaalde celtypes/-projecties en gedrag, is dierexperimenteel onderzoek essentieel.

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.

Perioperatieve zorg en pijnstilling, kooiverrijking. De dieren krijgen voedselbeloning tijdens het uitvoeren van taken.

## 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.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

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

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### **Ongeriefinschatting/humane eindpunten**

#### **H. Pijn en pijnbestrijding**

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voedselrestrictie, individuele huisvesting bij optogenetische experimenten (ter bescherming van hoofdkapje; van operatie tot aan euthanasie), voetschokken, operatie, eventueel ongerief tgv frustratie bij het niet krijgen van een beloning bij de gedragstaak.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Deze aantastingen zijn noodzakelijk voor het correct verlopen van het experiment.

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

Voedselrestrictie wordt tot een minimum beperkt. Individuele huisvesting wordt alleen gedaan wanneer dit strikt noodzakelijk is, namelijk tijdens de optogenetische experimenten of bij het monitoren van vrije voedselinname. Perioperatieve zorg.

#### **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.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies. Op basis van klinische verschijnselen worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.
- Motorische uitval of lethargie na operatie.

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

Maximaal 2% na de operatie.

### **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.

- Het meeste ongerief zullen de dieren ondervinden van de operatie, welke maximaal 1 a 2 keer zal plaatsvinden.
- Daarnaast kunnen de dieren regelmatig geïnjecteerd worden.
- Het grootste deel van het experiment zal bestaan uit operante conditioneringstaken waar geen ongerief aan ondervonden wordt.
- Incidenteel krijgen dieren voetschokken wat licht ongerief kan geven.
- Voedselrestrictie en individuele huisvesting die mogelijk worden toegepast geven ongerief.

Cumulatief classificeren we het ongerief op 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.

Doden is noodzakelijk omdat na het experiment [REDACTED] moet worden gecontroleerd. Dit kan alleen in het postmortem brein.

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                                  |
|------------|---|
| 2          | In vitro electrofysiologie <input type="text"/> |

*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.

Voor het in kaart brengen van neuronale circuits betrokken bij voedselgerelateerde keuzes is het van belang om de functionaliteit van een anatomisch circuit te bepalen. Wij gebruiken hiervoor . Cruciaal daarnaast is het uitvoeren van in vitro elektrofysiologie (postmortem) in neuronen die bij dit gedrag een rol spelen, zoals in de . We willen kijken naar de farmacologische parameters van de specifieke projecties (i.e. of ze GABAerg of glutamerg zijn) die worden bestudeerd tijdens de gedragstaken en hoe deze beïnvloed worden door  en verschillende farmaca (ghreline, leptine, etc).



[REDACTED]

Enkele primaire uitkomstparameters: de aard van verbindingen tussen hersengebieden (GABAerg of glutamaterg), [REDACTED] en enkele farmaca (ghreline, leptine, etc.) op elektrofysiologische parameters.

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.

Een deel van de dieren (~50%) zal eenmaal worden geopereerd zodat injecties [REDACTED] kunnen plaatsvinden. [REDACTED] worden [REDACTED] Een deel van deze 50% dieren zal voor een tweede keer geopereerd worden [REDACTED]

Van alle dieren zullen de hersenen gebruikt worden. Dit gebeurt na decapitatie (onder anesthesie) en is een terminaal experiment.

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

In vitro elektrofysiologie zal met name gebruikt worden bij elke projectie [REDACTED] (in deel A) wordt onderzocht; dit zijn 26 projecties in de rat en nog eens 13 in de muis. Per groep verwachten we ~10 dieren te willen onderzoek m.b.v. in vitro elektrofysiologie. Daarbij komt ~10% extra voor het in kaart brengen van de anatomie en het verifiëren van coördinaten (van breinstructuren) in dieren; dit maakt 11 per groep. (~300 ratten en 150 muizen)

Bij muizen zijn nog ~50 dieren extra gereserveerd omdat de vele Cre-lijnen die daarvan bestaan zeer informatief kunnen zijn mbt anatomische kennis. Dit zijn 5 dieren voor 10 verschillende Cre-lijnen.

## **B. De dieren**

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

300 ratten (geslacht niet van belang)

~200 Wistar Crl:WU

~100 [REDACTED] (eigen fok)

200 muizen (geslacht niet van belang)

~50 WT dieren (C57/Bl6)

~150 dieren van verschillende Cre-lijnen (in ieder geval [REDACTED])

Voor dit experiment zullen dieren van verschillende leeftijden worden gebruikt. Het geslacht is nu niet van belang omdat we bij dit onderdeel niet naar gedrag kijken; cyclische schommelingen bij vrouwen worden derhalve niet van invloed geacht op de uitleesparameters.

## **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.

Vermindering:

- We zullen zoveel mogelijk surplus dieren gebruiken voor dit experiment.
- We gebruiken zowel mannelijke als vrouwelijke dieren
- We kunnen per dier meerdere cellen meten.

Verfijning:

- Dieren hebben kooiverrijking en worden sociaal gehuisvest
- Bij de helft van de dieren zal het experiment uitsluitend terminaal zijn; dwz. er is tot aan het moment van decapitatie geen ongerief. De andere helft zal wel ongerief ondervinden (van de operatie).
- Bij de overige helft van de dieren is operatie het enige ongerief. Hierbij wordt perioperatieve zorg toegepast (warmtematje, pijnstilling, adequate anesthesie).

Vervanging:

- Omdat het van belang is om intact hersenweefsel te hebben, is het niet mogelijk om bijvoorbeeld celweek te gebruiken.

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.

In het geval van operatie: perioperatieve zorg. Verder worden de dieren in groepen gehuisvest en is er kooiverrijking aanwezig.

### **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.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Operatie(s) voor virusinjectie, euthanasie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

nvt

#### 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.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies. Op basis van klinische verschijnselen worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.
- Motorische uitval of lethargie na operatie.

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

Max. 2% van de geopereerde dieren.

#### 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.

Het ongerief is licht (50% dieren tgv operatie) of terminaal (50% dieren)

### 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.

We willen het brein extraheren.

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="In vivo elektrofysiologie en ██████████"/> |

*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 behulp van elektrofysiologie ██████████ willen we kijken wat de cellen binnen het ██████████ netwerk doen tijdens het uitvoeren van een operante conditioneringstaak waarbij een dier een voedselbeloning kan verdienen. Deze metingen van neuronale activiteit zullen worden gecombineerd ██████████



De diersoorten die we in dit onderdeel van het onderzoek willen gebruiken lopen parallel met de opto-/farmacogenetische experimenten van dit onderzoek. Hierdoor willen we in dezelfde diersoorten als daar deze experimenten uitvoeren.

De dieren zullen relatief jong binnenkomen (~2 maanden) omdat ze getraind moeten worden op de gedragstaken. Bovendien pakken jongere dieren makkelijker gedragstaken op dan oudere dieren.

Het geslacht is van belang omdat we naar gedrag kijken dat afhankelijk is van de menstruele cyclus. Zie voor de keuze van de diersoort ook deel A van deze aanvraag.

### 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.

Vermindering:

- Het niet mogelijk om surplusdieren te gebruiken. Voor de taak is het van belang dat de dieren naief zijn.
- Er is gekozen voor outbred stammen omdat we kijken naar voedselkeuze en het effect hiervan op bijvoorbeeld obesitas op latere leeftijd. Hierbij maken we juist gebruik van de individuele verschillen tussen dieren, door te kijken naar of de verschillen in gedrag voorspellend kunnen zijn voor obesitas.
- We gebruiken uitsluitend mannelijke dieren omdat de invloed van de hormooncyclus op voeding aanzienlijk is. Bovendien zijn onze eerdere resultaten allemaal verkregen uit manndieren, en in het kader van replicatie is het daarom van belang om ook mannen te gebruiken.
- Dieren worden herhaaldelijk gemeten, waarbij ze ook hun eigen controle kunnen zijn. Er komt zeer veel informatie uit een dier wat het totaal aantal dieren sterk beperkt.

Verfijning:

- Dieren worden tot aan de operatie in groepen gehuisvest
- Dieren hebben kooiverrijking
- Er wordt perioperatieve pijnbestrijding toegepast

- Adequate anesthesie wordt toegepast
- Warmtematjes tijdens en na operatie
- Fysiologisch zout na operatie

Vervanging:

- Omdat we kijken naar gedrag, zijn er geen alternatieve (in vitro) methoden.

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.

Perioperatieve zorg en pijnstilling, kooiverrijking.

## 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.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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



## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voedselrestrictie, individuele huisvesting [REDACTED], operatie, [REDACTED], eventueel ongerief door frustratie bij het niet verkrijgen van voedsel tijdens de gedragstaak.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Deze aantastingen zijn noodzakelijk voor het correct verlopen van het experiment.

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

Voedselrestrictie wordt tot een minimum beperkt. Individuele huisvesting wordt alleen gedaan wanneer dit strikt noodzakelijk is, namelijk tijdens de optogenetische experimenten of bij het monitoren van vrije voedselinname. Perioperatieve zorg.

### 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.

- Een verminderde conditie met daarbij substantieel gewichtsverlies. Op basis van klinische verschijnselen worden de dieren gewogen, en bij aanhoudend gewichtsverlies worden de dieren uit de proef genomen.
- Motorische uitval of lethargie na operatie.

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

Maximaal 5% na de operatie.

Dit is hoger dan in deel A van dit experiment ([REDACTED]) vanwege de complexiteit van de operatie.

### 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.

- Het meeste ongerief zullen de dieren ondervinden van de operatie.
- Daarnaast kunnen de dieren regelmatig geïnjecteerd worden.
- Tijdens de operante taak zal het dier aangesloten zijn op de elektrofysiologische apparatuur. Dit apparaatje kan op het begin enigszins zwaar zijn voor het dier, maar het lijkt hier geen langdurige hinder van te ondervinden.
- Ongerief ten gevolge van voedselrestrictie, individuele huisvesting en injecties.

Cumulatief classificeren wij het ongerief als 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.

Doden is noodzakelijk omdat na het experiment de expressie van het virus moet worden gecontroleerd. Dit kan alleen in het postmortem brein.

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

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** vrijdag 22 mei 2015 10:05  
**Aan:** info@ivd-utrecht.nl  
**CC:** [redacted]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** Aanvullende informatie aanvraag AVD115002015119

Geachte heer [redacted]

Op 20 mei heeft de CCD van u een aanvraag ontvangen met de titel "Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze", met aanvraagnummer AVD115002015119.

Het originele aanvraagformulier met de natte handtekening is nog niet bij ons binnengekomen.

Op de digitale kopie van het aanvraagformulier staat er geen rekeningnummer vermeld, daarom kunnen we de factuur niet sturen. Zou u zo vriendelijk zijn om dit nummer aan ons door te geven zodat wij de factuur kunnen maken?

De begindatum van het project ligt in het verleden. Zou u graag die willen aanpassen met een datum in de toekomst?

Alvast hartelijk bedankt.

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

UU-ASC  
o.v.v. CB.841910.3.01.011  
Postbus 80.011  
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  
AVD115002015119  
**Bijlagen**

Datum 26-05-2015  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 26 mei 2015  
Vervaldatum: 25 juni 2015  
Factuurnummer: 201570119

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002015119	€ 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.

**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** dinsdag 26 mei 2015 11:40  
**Aan:** info.ascf@uu.nl  
**CC:** info@ivd-utrecht.nl; [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** Factuur aanvraag projectvergunning AVD115002015119  
**Bijlagen:** Factuur AVD115002015119.pdf

Geachte heer/mevrouw,

Na aanleiding van uw verzoek sturen wij bij deze de factuur voor een nieuwe aanvraag projectvergunning met nummer AVD115002015119, uw referentie o.v.v. CB.841910.3.01.011.

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.

Met vriendelijke groet,

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 <info@ivd-utrecht.nl>  
**Verzonden:** dinsdag 26 mei 2015 9:58  
**Aan:** ZBO-CCD  
**CC:** [REDACTED] Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht; [REDACTED]  
**Onderwerp:** FW: Aanvullende informatie aanvraag AVD115002015119

**Categorieën:** Dossierhouder: [REDACTED]

Geachte mevrouw [REDACTED]

Hartelijk dank voor uw email. Onze excuses voor het niet compleet aanleveren van de aanvraag. Na telefonisch contact stuur ik bij deze de ontbrekende informatie:

Rekeningnummer: NL27INGB0000425267  
Begin datum project: 1 augustus 2015

Verder heb ik een email gestuurd naar de vergunninghouder over het aanvraagformulier. Deze zou namelijk 18 mei op de post zijn gegaan.  
Als blijkt dat het aanvraagformulier zoek geraakt is, zal ik de vergunninghouder vragen het aangepaste aanvraagformulier te ondertekenen en opnieuw te versturen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED] • Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht • Bolognalaan 50, 3584 CJ Utrecht • kamer [REDACTED]  
• Postbus 12007, 3501 AA Utrecht  
[info@ivd-utrecht.nl](mailto:info@ivd-utrecht.nl) • tel: 030 253 15 69 • aanwezig di, wo, do, vr



---

**From:** ZBO-CCD [<mailto:ZBO-CCD@minez.nl>]  
**Sent:** vrijdag 22 mei 2015 10:05  
**To:** Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht  
**Cc:** [REDACTED]@umcutrecht.nl  
**Subject:** Aanvullende informatie aanvraag AVD115002015119

Geachte heer [REDACTED]

Op 20 mei heeft de CCD van u een aanvraag ontvangen met de titel "Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze", met aanvraagnummer AVD115002015119.

Het originele aanvraagformulier met de natte handtekening is nog niet bij ons binnengekomen.

Op de digitale kopie van het aanvraagformulier staat er geen rekeningnummer vermeld, daarom kunnen we de factuur niet sturen. Zou u zo vriendelijk zijn om dit nummer aan ons door te geven zodat wij de factuur kunnen maken?

De begindatum van het project ligt in het verleden. Zou u graag die willen aanpassen met een datum in de toekomst?

Alvast hartelijk bedankt.

Met vriendelijke groet,



*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)

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.

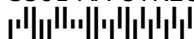
The State accepts no liability for damage of any kind resulting from the risks inherent in the electronic transmission of messages.



> 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  
AVD115002015119

**Bijlagen**

2

Datum 22-05-2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Op 19 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze met aanvraagnummer AVD115002015119. Uw aanvraag is helaas niet compleet. 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 te kunnen beoordelen:

Originele handtekening is nog niet ontvangen. De leges zijn nog niet betaald.

#### **Aanvraagformulier niet volledig**

Het aanvraagformulier is niet volledig ingevuld. Hierbij ontvangt u een kopie van het aanvraagformulier retour met daarop aangegeven op welk onderdeel of op welke onderdelen een aanvulling nodig is. Graag ontvangen wij het volledig ingevulde formulier van u terug.

#### **Leges**

De leges die u verschuldigd bent zijn nog niet door ons ontvangen of de betaling is nog niet verwerkt. Zoals in de factuur staat, moeten de leges binnen 30 dagen door ons zijn ontvangen. Uw aanvraag is niet compleet als de leges niet zijn ontvangen.

Zonder deze aanvullende informatie kunnen wij uw aanvraag niet in behandeling nemen.

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

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



u bij deze brief krijgt. Wanneer wij de aanvullende informatie niet binnen de gestelde termijn hebben ontvangen, zullen wij uw aanvraag buiten behandeling stellen.

**Wanneer een beslissing**

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.

**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:

- Melding Bijlagen

# Melding bijlagen

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

Naam instelling: UMC Utrecht

Adres: .....

Postcode en plaats: .....

Aanvraagnummer: AVD115002015119

## 2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

Vul de naam of omschrijving van de bijlagen in.

1. ....

2. ....

3. ....

4. ....

### **3 Ondertekening**

Naam: .....

Datum: ..... - ..... - .....

Handtekening: .....

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

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.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)

Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD115002015119

Datum 25 juni 2015  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning dierproeven

Bijlagen  
1

Geachte [REDACTED]

Op 19 mei 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze' met aanvraagnummer AVD115002015119. 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 'Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze' starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2015 tot en met 30 april 2020.

#### 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, met een uitzondering: de dieren die in dierproef 'In vitro electrofysiologie en functionele mapping' twee keer een operatie ondergaan worden als matig ongerief geclassificeerd. 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**  
25 juni 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015119

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 deeluitmakend: - DEC-advies
  - Weergave wet en regelgeving



# 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 checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   11500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																				
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td>UMC Utrecht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[Redacted]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>30244197</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]	KvK-nummer	30244197														
Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht																					
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]																					
KvK-nummer	30244197																					
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>	<table border="1"><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>12007</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>3501 AA   Utrecht</td></tr><tr><td>IBAN</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Utrecht</td></tr></table>	Straat en huisnummer	t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht	Postbus	12007	Postcode en plaats	3501 AA   Utrecht	IBAN		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht										
Straat en huisnummer	t.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht																					
Postbus	12007																					
Postcode en plaats	3501 AA   Utrecht																					
IBAN																						
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht																					
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr.</td><td><input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr.	<input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]			Afdeling	[Redacted]			Telefoonnummer	[Redacted]			E-mailadres	[Redacted]		
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr.	<input type="checkbox"/> Mw.																			
Functie	[Redacted]																					
Afdeling	[Redacted]																					
Telefoonnummer	[Redacted]																					
E-mailadres	[Redacted]																					
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[Redacted]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr.</td><td><input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[Redacted]</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[Redacted]</td><td></td><td>@umcutrecht.nl</td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr.	<input type="checkbox"/> Mw.	Functie	[Redacted]			Afdeling	[Redacted]			Telefoonnummer	[Redacted]			E-mailadres	[Redacted]		@umcutrecht.nl
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr.	<input type="checkbox"/> Mw.																			
Functie	[Redacted]																					
Afdeling	[Redacted]																					
Telefoonnummer	[Redacted]																					
E-mailadres	[Redacted]		@umcutrecht.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	Dhr.	Mw.
	Functie		
	Afdeling		
	Telefoonnummer		
	E-mailadres		
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag		
	<input type="checkbox"/> Nee		

## 2 Over uw aanvraag

2.1 Wat voor aanvraag doet u?	<input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
	<input type="checkbox"/> Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
2.2 Is dit een <i>wijziging</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?	<input type="checkbox"/> Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
2.3 Is dit een <i>melding</i> voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?	<input checked="" type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3
	<input type="checkbox"/> 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	01	.05	.2015
	Einddatum	30	.04	.2020
3.2 Wat is de titel van het project?	Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze			
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Hersenverbindingen die betrokken zijn bij voedselkeuze			
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.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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 [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Utrecht [REDACTED]

Datum 13 - 05 - 2015 [REDACTED]

Handtekening [REDACTED]







## 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 augustus 2015 tot en met 30 april 2020, voor het project 'Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze' met aanvraagnummer AVD115002015119, 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 19 mei 2015;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 19 mei 2015;
  - b. Niet-Technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 19 mei 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie DEC Utrecht d.d. 13 mei 2015 en ontvangen op 19 mei 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Optogenetische en farmacogenetische manipulatie van voedselkeuze	- Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) (man): Wistar Crl:WU; TH::Cre - Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) (man): C57/Bl6 en verschillende Cre-lijnen	1000 ratten: 750- Wistar Crl:WU 250- TH::Cre 500 muizen: 200- WT (C57/Bl6) 300- Cre-lijnen	Matig
In vitro electrofysiologie en functionele mapping	- Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) (man en vrouw): Wistar Crl:WU; TH::Cre - Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) (man en vrouw): C57/Bl6 en verschillende Cre-lijnen	300 ratten: 200- Wistar Crl:WU 100- TH::Cre 200 muizen: 50- WT (C57/Bl6) 150- Cre-lijnen	Licht- 25% Matig- 25% Terminaal- 50%
In vivo elektrofysiologie en optometrie	- Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) (man): Wistar Crl:WU; TH::Cre - Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) (man): C57/Bl6 en verschillende Cre-lijnen	300 ratten: 150- Wistar Crl:WU 150- TH::Cre 150 muizen: 100- WT (C57/Bl6) 50- Cre-lijnen	Matig

### Voorwaarde:

In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van

**Datum**  
25 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015119

deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **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 onvermijdelijk 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 blijvende schade zal blijven

Met vriendelijke groet,



*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)

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:** donderdag 25 juni 2015 10:18  
**Aan:** dec-utrecht@umcutrecht.nl  
**Onderwerp:** Terugkoppeling beslissing aanvraag AVD115002015119

Geachte heer/mevrouw,

Op 13 mei 2015 heeft de DEC Utrecht advies uitgebracht aan de CCD betreffende het project 'Neuronale circuits die betrokken zijn bij voedselkeuze', uw referentie 2015.I.527.006. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD kon zich vinden in de inhoud van uw advies, met een uitzondering: de dieren die in dierproef 'In vitro electrofysiologie en functionele mapping' twee keer een operatie ondergaan worden als matig ongerief geclassificeerd.

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

**Datum**  
25 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002015119

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.



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

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

### 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- 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.



De sponsor van deze studie heeft een universeel antilichaam preparaat ontwikkeld dat infectie van influenza A virus kan tegengaan door inhibitie van de vermenigvuldiging van het virus. Het werkingsmechanisme van dit antilichaam preparaat bestaat uit het neutraliseren van meerdere influenza type A virussen (zowel laag pathogene seizoensvirussen als hoog pathogene aviaire virussen) door het tegengaan van fusie van het virus met de gastheercel. Door middel van geavanceerde onderzoekstechnieken heeft de sponsor een epitootop gevonden in het oppervlakte eiwit van influenza dat geconserveerd is in alle bekende influenza type A virussen en dat vanwege het conformationele karakter van het oppervlakte eiwit niet gevoelig is voor resistentie mutatie. Vanwege het breed toepasbare karakter van dit middel is het in staat om infectie van zowel laag (seizoens) en hoog (pandemisch) pathogeen influenza virus te voorkomen. Daarnaast kan het middel ingezet worden als behandeling van reeds met influenza geïnfecteerde personen.

Echter de regelgevende autoriteiten (FDA en EMA) hebben de sponsor van de studie opgelegd om te bepalen of lage (sub-neutraliserende) doses van het antilichaam preparaat geassocieerd zijn met een verergerd ziektebeeld, ook wel antilichaam afhankelijke verergering (ADE: antibody dependent enhancement) genoemd. Dit fenomeen is in het verleden reeds aangetoond voor verschillende virale infecties in de meeste gevallen in vitro, maar in een aantal gevallen ook in vivo. Zeer recentelijk zijn bewijzen gevonden dat een dergelijk fenomeen ook bij influenza infecties het geval zou kunnen zijn. Tijdens de uitbraak van Mexicaanse griep in 2009 is een verergerd ziektebeeld aangetoond bij meerdere patiënten welke in het verleden gevaccineerd waren met een seizoens influenza vaccin welke niet de Mexicaanse griep component bevatte (Skowronski; PlosMedicine 2010). In een vervolg in vitro studie werd aangetoond dat niet volledig overeenkomende antilichamen een verhoging van de infectie veroorzaakten in plaats van dat ze het virus neutraliseerden. Dit werd bevestigd in een fretten studie, waarin het risico van verergerd ziektebeeld werd aangetoond na vaccinatie met het 2008-2009 influenza vaccin en challenge met het Mexicaanse griep virus (welke niet was vertegenwoordigd in het vaccin)(Skowronski; PlosOne 2014). Dit fenomeen is vervolgens nagebootst in het varken-model in een soortgelijke opzet (Gauger Vaccine 2011).

In opeenvolgend onderzoek waarin het mechanisme achter deze verergering van het ziektebeeld werd bestudeerd, werd gevonden dat kruis-reactieve haemagglutinine (HA)-bindende antilichamen geassocieerd waren met het verergerde ziektebeeld. Antilichamen geïnduceerd door de vaccinatie neutraliseerden wel het vaccin-virus, maar konden alleen binden aan het challenge virus zonder neutraliserende capaciteit. Er werd aangetoond dat de antilichamen, die wel konden binden maar het virus niet konden neutraliseerden, een verandering in het HA eiwit induceerden. Deze verandering zorgde ervoor dat fusie van het virus met de gastheercellen makkelijker ging en daardoor de infectie bevorderde. Structurele analyse van het antilichaam preparaat dat uitgetest zal worden in deze studie heeft aangetoond dat binding aan het HA eiwit niet deze conformationele verandering induceert. Naast dit mechanisme van conformationele verandering kan ADE ook geïnduceerd worden door een Fc-gemedieerd proces. Bij dit proces kunnen de viruspartikel-antilichaam complexen verhoogd opgenomen worden door macrofaag-achtige cellen via hun Fc-receptor en vervolgens deze cellen infecteren. Echter, voor meerdere antilichaam preparaten is reeds aangetoond dat Fc interactie leidt tot een effectievere behandeling in plaats van verergering van infectie/ziektebeeld.

In de hier beschreven studie zullen alle hierboven omschreven aspecten bestudeerd worden. Er is reeds aangetoond dat het te testen antilichaam een interactie aan kan gaan met de receptoren op de macrofagen van de muis, zodat zowel bestudeerd kan worden of deze Fc interactie een beschermende dan wel verergerende capaciteit induceert. De doseringen die uitgetest zullen worden volgen een range van volledig neutraliserende (20 mg/kg zoals al eerder door de opdrachtgever is aangetoond, maar niet beschikbaar is in het publieke domein) tot sub- en niet-neutraliserende waarden. Als uitleesparameter zal zowel gekeken worden naar virale load in de longen (als marker voor veiligheid) als naar klinische verschijnselen (als marker voor effectiviteit). Het translationele karakter van de hierboven genoemde effectiviteit in het influenza muismodel is al eerder beschreven voor influenza-specifieke antilichaam preparaten welke op dit moment al uitgetest worden in de kliniek in zowel profylactische als therapeutische setting (Ekiert et al, Science, 2011), maar ook in-huis gegenereerde data van soortgelijke preparaten welke nog niet in het publieke domein zijn.

Aangezien het hier gekozen muismodel gebruikt kan worden voor zowel de bestudering van bescherming tegen infectie na behandeling als verergering van het ziektebeeld (zie voor beide punten de tekst hierboven), kunnen de resultaten gebruikt worden voor de vervolgstappen van het hier uit te testen antilichaam preparaat, namelijk voorkoming van influenza infectie en behandeling van influenza geïnfekteerde personen. Omdat het antilichaam preparaat, indien het werkingsmechanisme beschermend is en niet verergerend, zowel gebruikt kan worden voor behandeling van individuen geïnfekteerd met laag pathogene seizoensvirussen als hoog pathogene aviaire virussen, kunnen de resultaten van deze studie gebruikt worden om het antilichaam preparaat uit te testen in influenza geïnfekteerde individuen zoals omschreven in het maatschappelijk belang (zie punt 3.3). In de huidige studie zullen twee prototype influenza A virussen gebruikt worden. Het jaarlijkse influenza vaccin bevat altijd een H1N1 en een H3N2 virus en de hier gekozen virussen vallen in 1 van deze twee klassen; daarnaast zijn dit virussen die door middel van muis adaptatie meer pathogeen zijn in muizen. Aangezien de resultaten gebruikt zullen worden voor een go-no go van een klinisch programma, zullen in verband met de tijdslijnen beiden virussen in 1 en dezelfde studie gebruikt gaan worden.

### 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 doel van het project is de bestudering van de effectiviteit en veiligheid van het hier uit te testen antilichaam tegen infectie met influenza virus. Op basis van voorbereidend onderzoek (structurele analyse van viruspartikel-antilichaam complexen en Fc-receptor binding) is de verwachting dat dit preparaat niet zal leiden tot verergering van het ziektebeeld zoals omschreven bij de achtergrond. Echter dit onderzoek is opgelegd vanuit de regelgevende autoriteiten en vanuit dat oogpunt noodzakelijk/verplicht. Aangezien in eerdere experimenten aangetoond is dat 20 mg/kg het virus volledig kan neutraliseren, zal deze dosering in dit experiment één van de gate-keepers zijn (isotype controle welke niet zal beschermen zal de andere gate-keeper zijn). De lagere verdunningen zullen dienen als uitleesparameter voor verergering, maar kunnen daarnaast ook aanwijzingen leveren over de minimale ondergrens van dit preparaat. Binnen deze studie zijn er dus twee uitkomsten mogelijk waarvan de tweede optie op basis van voorwerk het minst aannemelijk is:

1. Bescherming tegen infectie/ziekte (effectiviteit)
2. Verergering van infectie/ziekte (veiligheid)

### 3.3 Belang

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

Er is een constante dreiging op het uitbreken van een humane influenza pandemie. Voorbeelden hiervan zijn de voortdurende uitbraak van H5N1 virussen (vanaf 1997), de humane H7N7 gevallen (2003), de uitbraak van Mexicaanse griep in 2009 en het opkomen van H5N8 zeer recent. Sinds 19 februari 2013 behoort ook het H7N9 influenza virus tot de virussen die geïntroduceerd zijn in de humane populatie en waartegen geen natuurlijke bescherming bestaat. Infectie met deze (vaak hoog pathogene) pandemische influenza virussen leidt in veel gevallen tot een zware lagere luchtweginfectie en op het moment van de uitbraak zijn er nog geen specifieke vaccins beschikbaar. Daarnaast is er elk jaar druk van seizoens influenza virussen die een hoge mortaliteit en morbiditeit induceren en daardoor een hoge economische impact hebben. Helaas blijkt dat resistentie ontwikkeling tegen de bestaande antivirale therapieën steeds vaker wordt aangetoond bij zowel pandemische als seizoens influenza virussen. Derhalve is men op zoek naar alternatieve profylactische en therapeutische behandelmethoden tegen infectie met influenza virussen. Voor hoog pathogene (mogelijk pandemische) influenza virussen zal het gebruik van dergelijke preparaten voornamelijk zijn op therapeutische basis aangezien op voorhand niet te voorspellen valt wanneer de volgende influenza pandemie zal komen. Echter er kan wel gedacht worden bij het daadwerkelijk uitbreken van een pandemie om kwetsbare doelgroepen op voorhand te beschermen,

waarbij men kan denken aan longpatiënten, immuungecompromitteerden en medisch personeel dat geïnfecteerde individuen zal behandelen). Voor de laag pathogene seizoens influenza virussen zal het gebruik juist voornamelijk op profylactische basis zijn (dus juist voor de start van het influenza seizoen, indien de halfwaarde tijd dusdanig goed is. Een dergelijk regime is al beschikbaar voor een andere infectieziekte die vooral bij jonge kinderen met onderliggend leiden problemen geeft, namelijk respiratoir syncytieel virus (RSV). Deze kinderen worden voor het begin van het RSV seizoen behandeld met een antilichaam preparaat (en ook 1 of 2 keer tijdens het seizoen) en daarin ziet men een afname van RSV-gerelateerde ziekte. Een dergelijk regime zal ook geschikt zijn voor profylactische behandeling tegen influenza infecties in kwetsbare doelgroepen. Daarnaast is het uiteraard ook mogelijk om het middel in te zetten als therapeuticum bij individuen die op voorhand niet behoren tot de kwetsbare doelgroepen, maar na infectie met laag pathogeen influenza virus toch ernstige symptomen laten zien. Het universele antilichaam preparaat dat in deze studie uitgetest zal worden en dat in staat is een influenza infectie te remmen/ te stoppen en/of het ziektebeeld te kunnen verminderen, is een voorbeeld van een preparaat dat voor bovenstaande doeleinden (profylactische en therapeutische behandeling) gebruikt kan worden. Echter naast een bescherming van de ziekte is het mogelijk dat behandeling met een dergelijk universeel antilichaam preparaat verergering van ziekte kan induceren zoals beschreven na de uitbraak van Mexicaanse griep virus. Op basis van deze en andere resultaten hebben de regelgevende instanties (in dit geval de Amerikaanse "Food and Drug Administration") besloten dat elk influenza-specifiek universeel antiviraal middel getest moet worden op zowel effectiviteit/werkzaamheid als op veiligheid.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

In deze studie zullen dieren na infectie met de twee verschillende laag-pathogene seizoens influenza virussen (H1N1 en H3N2) therapeutisch behandeld worden met verschillende doseringen van het universele influenza-specifieke antilichaam preparaat en als controle zal een niet specifiek antilichaam preparaat meegenomen worden voor beide uit te testen virussen. Dit niet specifieke antilichaam preparaat is een isotype controle (zelfde type antilichaam als het influenza specifieke, echter met een niet relevante specificiteit) en zal dienen als negatieve controle binnen het experiment. Deze negatieve controle groepen zijn nodig om de vraag te beantwoorden of de observaties na toediening van het specifieke preparaat geassocieerd zijn met het toedienen hiervan of met de specifieke herkenning van het virus door het preparaat. Voor deze studie is gekozen voor twee seizoens-influenza virussen welke aangepast zijn aan de muis, zodoende kunnen dieren met een relatief lage dosis geïnfecteerd worden en lijkt de infectie dosis op dat van een natuurlijke infectie in de mens. Alhoewel hier gesproken wordt over laag-pathogene virussen, zal het ongerief door infectie toch geklassificeerd worden als matig (Time Course en kortlopend deel van effectiviteit en veiligheid) of ernstig (langlopende deel van effectiviteit en veiligheid). Dit komt omdat het karakter "laag-pathogeen" slaat op de ziekte die het zou veroorzaken bij infectie van mensen (het betreffen hier seizoens-influenza virussen). Echter door adaptatie aan de muis zijn deze virussen pathogener geworden in de muis, vandaar de combinatie "laag-pathogeen" en "matig of ernstig ongerief". Zowel de bescherming als de veiligheid zullen onderzocht worden op basis van onderstaande parameters:

1. virale load (tijdstip zal bepaald worden in het eerste experiment "Time Course")
2. klinische observaties (gedrag, uiterlijk, gewicht en mortaliteit) over een looptijd van 14 dagen
3. pathologie op 14 dagen na infectie

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

##### Experiment 1: Time course

In dit experiment zal bepaald worden op welke dag na infectie de piek van de virus replicatie plaatsvindt en deze resultaten zullen gebruikt worden om experiment 2 "Effectiviteit en veiligheid" te verfijnen. In dit experiment 1 zullen muizen geïnfecteerd worden met een virale dosis zoals eerder bepaald in dose-finding studies waarbij de dieren een sublethale infectie zullen krijgen. Op verschillende momenten na infectie (dag 0 t/m dag 5) zullen per virus (H1N1 of H3N2) vijf dieren uit de studie gehaald worden voor het bepalen van de virale load in de longen.

#### Experiment 2: Effectiviteit en veiligheid

In dit experiment zullen dieren eerst geïnfecteerd worden op dezelfde wijze als in experiment 1, echter zullen alle dieren op 24 uur na infectie behandeld worden met ofwel het universele antilichaam preparaat ofwel het controle preparaat. Relatief kort na infectie (zoals bepaald in experiment 1 "Time Course") zal per groep een aantal dieren uit de studie gehaald worden voor het bepalen van de virale load in de longen als marker voor veiligheid. De resterende dieren zullen vervolgens bestudeerd worden op basis van klinische observaties (als marker voor effectiviteit) tot 14 dagen na infectie. Op dag 14 (of eerder indien dieren het humane eindpunt bereiken) zullen de dieren uit de studie gehaald worden.

NB: voor een meer gedetailleerde beschrijving van de afzonderlijke dierproeven zie de bijlagen: beschrijving dierproef 1 en 2.

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.

Experiment 1 "Time Course" zal het voorbereidende werk zijn voor het experiment 2 "Effectiviteit en veiligheid". Resultaten uit experiment 1 zullen aantonen op welke dag na infectie de piek van de replicatie in de longen zal plaatsvinden en deze resultaten zullen gebruikt worden om het eerste euthanasie moment te bepalen na infectie in experiment 2 "Effectiviteit en veiligheid".

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Time Course
2	Effectiviteit en veiligheid
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

██████████  
Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD905002015121

**Bijlagen**

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 25 juni 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD905002015121. 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: [REDACTED]  
Afdeling: [REDACTED]  
Telefoonnummer: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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 juli 2015  
Geplande einddatum: 1 juli 2017  
Titel project: Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen.  
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid van een medicijn tegen infectie met influenza virus in muizen.  
Naam DEC: Stichting DEC consult  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Schaijk

Datum:

25 juni 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD905002015121

**Bijlagen**

2

Datum 29-06-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 29 juni 2015

Vervaldatum: 29 juli 2015

Factuurnummer: 201570121

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD905002015121	€ 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.



- Strekking van de vragen ter completering van de aanvraag:
  - Doelcategorie project
  - Achtergrond, doelstelling en belang
  - Keuzes en onderbouwing bij de voorgestelde aanpak.
  - De onderbouwing van de inschatting van het ongerief.
  - De 3V alternatieven.
  - Het invullen van vraag E in de bijlage (wettelijk voorgeschreven onderzoek).
  - Onderscheid tussen pijn (vraag H) en ongerief (vraag I)
  - De leesbaarheid van de NTS
  - Het aansluiten van de NTS bij de project beschrijving..
- Datum antwoord 21 mei 2015
- Strekking van het (de) antwoord(en)
  - De antwoorden hebben geleid tot bijstellingen van de concept aanvraag.
- Datum 28 mei 2015
- Strekking van de vraag / vragen
  - Doel/belang (de wettelijk eis vanuit de FDA)
  - De beoogde doelgroep van het te testen middel.
  - Het opvoeren bij verfijning van handelingen die standaard zijn bij het houden van proefdieren.
  - Bij ernstig ongerief rapportage achteraf.
  - Verbetering NTS
- Datum antwoord 4 juni 2015
- Strekking van het de antwoorden
  - De antwoorden hebben geleid tot bijstellingen van de concept aanvraag..
- Datum 11 juni 2015
- Strekking van de vraag / vragen
  - De te gebruiken dieren
  - Inkorten van de NTS
  -
- Datum antwoord 12 juni 2015
- Strekking van het (de) antwoord(en)

- De antwoorden hebben geleid tot completering van de aanvraag
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) nvt de DEC zelf beschikt over de relevante expertise

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

1. Het project is vergunning plichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag
3. De DEC is competent om hierover te adviseren
4. Geen van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager.

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

1. Het project is:
  - X uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
  - X wettelijk vereist (de FDA eist dit onderzoek in verband met de veiligheid van het product voordat dit bij de mens kan worden toegepast.)
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategoriën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstellingen. Naast een onmiskenbaar wetenschappelijk belang zullen de uitkomsten van dit onderzoek aantonen of het gebruik van het te testen middel veilig is om bij de mens te worden toegepast en niet onbedoeld een patient ernstiger ziek maakt in plaats van geneest. Het belang wordt ingeschat als essentieel, mede gezien het risico op ernstige ongewenste neveneffecten bij ongecontroleerde toepassing bij de mens.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen van het project. De aanvrager heeft de kennis en de expertise om de voorgestelde experimenten uit te voeren.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De toegepaste methode van anesthesie en euthanasie zijn conform de richtlijn.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief voor dieren die ernstige longontsteking krijgen wordt ingeschat als ernstig, maar door intensieve monitoring en toepassing van humane eindpunten zal de duur hiervan zo veel mogelijk beperkt worden.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. Het te onderzoeken middel is voorafgaand al in vitro op gunstige eigenschappen getest. Het mogelijk verergeren van ziekte door dit middel kan alleen in het intacte dier worden bestudeerd.
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.
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**

Gezien de ernst van een influenza infectie bij kwetsbare groepen patiënten en het feit dat de huidige anti-virale middelen niet altijd werkzaam blijken te zijn, is de commissie van mening dat het ethisch toelaatbaar is voor de ontwikkeling van preventieve strategieën ter voorkoming van influenza proefdieronderzoek in te zetten. De ervaring uit het verleden dat een middel juist een averechts effect kan hebben maakt dit onderzoek essentieel voordat dit middel bij kwetsbare patiënten kan worden toegepast. Uitvoering van het project levert voordelen op voor de mens. De schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij de dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat.

Het project dient ook een belangrijk wetenschappelijke doel en het is zeer waarschijnlijk dat ook deze doelen worden gehaald.

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
  - Op grond van de wettelijk vereiste (risico op (kortdurend) ernstig ongerief) dient de projectleider bij beëindiging van het project een rapportage aan te leveren aan de CCD die is afgestemd met de IvD.

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



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert B.V.	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Time Course

*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.

Dit time course experiment is nodig om te bepalen op welke dag na infectie met influenza virus de piek van de replicatie in de longen zal plaatsvinden. Virale load is dan ook de primaire uitkomstparameter. Deze resultaten zullen gebruikt worden om het eerste euthanasie moment te bepalen na infectie in dierproef 2 "Effectiviteit en veiligheid".

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.

Dieren zullen op dag 0 intranasaal geïnfecteerd worden met ofwel muis-geadapteerd H1N1 ofwel muis-geadapteerd H3N2 influenza virus. Deze route is normaal ook de port-d'entree voor dit virus. Op dag 0 t/m 5 zal elke dag een vast aantal dieren per virus geëuthanaseerd worden. De longen zullen gebruikt worden voor het bepalen van de virale load. Daarnaast zullen de dieren elke dag geobserveerd worden, klinische score genoteerd worden en lichaamsgewicht gemeten worden. Op basis van het bereiken van het humane eindpunt kunnen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald, echter eerste resultaten van deze virussen in de hier te gebruiken muizenstam (uitgevoerd onder een ander vergund protocol) hebben laten zien dat tijdens de looptijd van deze kortdurende studie van 5 dagen geen humaan eindpunt bereikt zal worden.

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

De dose finding experimenten van de hier te gebruiken virussen in combinatie met deze muizenstam zullen elders uitgevoerd worden door derden. Resultaten van deze dose finding zullen gebruikt worden om de optimale virus dosis te bepalen voor dit experiment. Daarnaast zal er rekening gehouden worden in dit experiment met de gevonden statistische spreiding in de dose finding experimenten.

Geschat maximum aantal: 120 dieren



Onderbouwing: 30 dieren per virus (60 dieren in totaal) en daarnaast de mogelijkheid om de groepsgrootte te verhogen indien resultaten in de voorbereidende experimenten hiertoe aanleiding geven (zie hierboven). De verwachting is dat dit niet leidt tot meer dan het dubbele aantal dieren, dus het geschatte maximum aantal voor deze studie zal 120 dieren zijn. Echter, als de resultaten van de voorbereidende dierstudies (dose finding door derden) laten zien dat dit hoge aantal niet nodig is op basis van statistische spreiding, zal de studie uiteraard aangevangen worden met minder dieren. Aangezien deze resultaten nog niet beschikbaar zijn, kan op voorhand de kans hierop niet ingeschat worden. In de studie zullen dieren geïnfecteerd worden met H1N1 of H3N2 en op de verschillende dagen na infectie (dag 0 t/m dag 5) zal per virus 5 dieren per groep geëuthanaseerd worden. Op basis van eerdere resultaten, reeds gepubliceerde data en de gekozen dosis is het de verwachting dat het influenza virus zal repliceren in alle dieren. In dit experiment zijn we op zoek naar de dag waarop de piek van de replicatie plaatsvindt. Aangezien de verwachting is dat alle dieren geïnfecteerd worden, kan op basis van de publicatie van Richardson en Overbaugh (JV 2005, Tabel 2) geconcludeerd worden dat met 5 dieren per groep een significant verschil ( $p < 0.05$ ) aangetoond kan worden tussen geïnfecteerde dieren (dag 1 t/m 5) en controle dieren (dag 0).

## B. De dieren

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

Diersoort: vrouwelijke CD-1 muizen.

Experiment 2 (effectiviteit en veiligheid) zal gericht zijn op het wel of niet induceren van antilichaam afhankelijke verergering. Voor de bestudering hiervan dient een muizenstam gebruikt te worden met een compleet immuunsysteem, aangezien het immuunsysteem een grote rol speelt in het proces van antilichaam afhankelijke verergering. Voor de studie naar antilichaam afhankelijke verergering dient een zo wild-type mogelijk immuunsysteem beschikbaar te zijn. In het algemeen kunnen inteelt muizenstammen vanwege hun inteelt-karakter deficiënt zijn op 1 of meerdere vlakken van het immuunsysteem en derhalve minder geschikt om een dergelijk complex systeem als het immuunsysteem te bestuderen (het is nog steeds niet volledig bekend welke deficiënties een invloed hebben op zowel het specifieke als adaptieve deel van het immuunsysteem). Outbred muizen daarentegen kunnen worden gezien als immuuncompetente muizen en zijn dan ook beter geschikt om dit soort experimenten uit te voeren. Daarnaast zijn in de literatuur meerdere studies beschreven voor andere virale infecties met onder andere Dengue virus en Ebola virus (Puerta-Guardo et al Journal of Virology 2013) en is deze muizenstam ook gebruikt voor het genereren en uittesten van muis-geadapteerd influenza virus (Brown PNAS 2001). In deze experimenten zal gebruik gemaakt worden van vrouwelijke muizen om agressie binnen de groepen tot een minimum te beperken.

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

Levensstadium: 6-8 weken oud bij start van het experiment

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: deze dierproef is opgezet om de replicatie kinetiek van de twee muis-geadapteerde influenza virussen te bestuderen in de longen van muizen. Een dergelijke studie is niet mogelijk in een in vitro model en derhalve is het niet mogelijk om dit in vitro uit te voeren. Vooraf zal wel zeer nauwkeurig bepaald worden in in vitro kweeksystemen wat de titer is van de hier uit te testen influenza stock, zodat de studie

weloverwogen ingezet kan worden.

Vermindering: Tijdens de studie zullen zo veel mogelijk parameters beoordeeld worden in deze studie (virologie, pathologie en klinische observaties), zodat zoveel mogelijk waarnemingen uit een dier verkregen worden.

Verfijning: Meest invasieve handelingen (intranasale infectie en euthanasie) zullen uitgevoerd worden onder sedatie (isofluraan 3% / O<sub>2</sub>). Daarnaast zullen de dieren dagelijks gewogen worden. Observaties worden geïntensiveerd naarmate de klinische verschijnselen toenemen. Daarnaast is besloten na literatuur onderzoek om de looptijd van deze time-course te beëindigen op dag 5 na infectie. Eerdere studies hebben laten zien voor verschillende influenza virus / muizenstam combinaties, dat de piek van de virus replicatie zal liggen binnen deze tijdsperiode en dat latere tijdstippen geen toegevoegde waarde hebben. Daarnaast is het zo dat alhoewel binnen deze tijdsperiode de hoogste virale load in de longen zal zijn, de klinische verschijnselen zich pas later zullen manifesteren. Deze werkwijze zorgt ervoor dat zo min mogelijk dieren gebruikt wordt, maar ook dat de studie gestopt wordt voor het ontwikkelen van klinische verschijnselen (ongerief).

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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden in HEPA gefilterde IVC bakken, handelingen uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet en afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) aangeboden zal worden voor destructie. De gehele studie wordt uitgevoerd onder BSL II ingeperkte condities.

## 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.

Met behulp van literatuur studie is gekeken of eerdere experimenten uitgevoerd zijn, waarin een dergelijke vraagstelling is bestudeerd. In de literatuur zijn meerdere studies beschreven waarin muis-geadapteerde influenza virussen zijn bestudeerd. Echter, in deze studie betreft het een nieuw opgegroeid virus, waarvan niet bekend is of de kinetiek van de infectie hetzelfde verloop heeft. Wel kan uit deze studies (en eerder zelf uitgevoerde maar niet publiekelijk beschikbare studies) gedestilleerd worden dat de piek van de replicatie binnen 5 dagen na infectie zal plaatsvinden en derhalve zal deze studie ook niet langer duren dan 5 dagen. Reeds gepubliceerde studies hebben over het algemeen langere looptijden tot wel 10-14 dagen na infectie. Tevens betreft het hier voorwerk voor dierproef #2, een studie die vanuit regulatorisch oogpunt uitgevoerd dient te worden voordat het hier uit te testen antilichaam preparaat in een klinische studie uitgetest kan worden.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. kortademigheid en gewichtsverlies
2. Eventuele verwondingen door agressie binnen de groep. Kans hierop is klein, maar kan nooit uitgesloten worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. longontsteking door infectie met influenza
2. Gebruik van dieren die voorheen niet samen gehuisvest waren.

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

1. De looptijd van de studie is dusdanig dat deze verschijnselen niet verwacht worden. Echter indien wel schadelijke effecten gezien worden, is het niet mogelijk om analgetica (NSAID, aspirine of paracetamol) te gebruiken. In het algemeen hebben deze middelen een ontstekingsremmende werking en zullen dus in het hoofdexperiment (2: effectiviteit en veiligheid) nooit gebruikt kunnen worden. In dit experiment zal worden onderzocht hoe het ziekteproces verloopt en daarbij is een goed functionerend immuunsysteem vereist. Voorbereidend werk kan dan niet uitgevoerd worden met dergelijke analgetica.
2. Dieren zullen zover mogelijk besteld worden uit een grote batch die bij de fokker al in 1 groep gehuisvest waren. Daarnaast zullen de experimenten uitgevoerd worden met vrouwelijke dieren, aangezien agressie onderling minder aangenaam is dan bij groepshuisvesting van mannelijke dieren.

### 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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden op de volgende criteria en bij matig ongerief (klinische score 3) uit de proef worden gehaald door middel van euthanasie:

- 0. Geen klinische verschijnselen (geen ongerief)
- 1. Ruwe vacht (gering ongerief)
- 2. Ruwe vacht, verminderd alert, passief bij handelingen (gering ongerief)
- 3. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, passief bij handelingen (matig ongerief)

- 4. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, lethargisch (ernstig ongerief).

Daarnaast zullen de dieren uit de proef gehaald worden als de dieren niet meer zelfstandig water en/of voer tot zich kunnen nemen.

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

Op basis van voorbereidend werk is de verwachting dat de kans op humaan eindpunt score 3 of 4 = 0% zal zijn. 100% van de dieren zal kans hebben op het verkrijgen van klinische score 1 en naar schatting 50% van het oorspronkelijke aantal dieren klinische score 2.

### 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.

Op basis van de hierboven beschreven negatieve effecten en het voorbereidende werk zal het cumulatieve ongerief ingeschaald worden op gering, met andere woorden bij kortdurend matig ongerief zullen de betreffende dieren uit de studie gehaald worden.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Dieren zullen worden gedood om vervolgens de virale load in de longen te bepalen. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven van de dieren.

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

## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, 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'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure orthotopic (femoral condyle) and ectopic (subcutaneous) implantation

## 2 Description of animal procedures

### A. Experimental approach and primary outcome parameters

---

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

---

The experiment will use the 6 experimental groups as described in section 3.4.1 for implantation in femoral condyle defects as well as subcutaneous in the same animals. These experimental groups consist of bone regenerative constructs based on calcium phosphate ceramic granules, either or not combined with (combinations of) human cells (i.e. adipose tissue derived mesenchymal stem cells, stromal vascular fraction, monocytes, or combinations thereof; mesenchymal stem cells and stromal vascular fraction are obtained from healthy donors after informed consent, monocytes are from a human monocytic cell line).

To study the biological performance (i.e. bone regenerative capacity) of (cell-laden) constructs, a femoral condyle implantation model (orthotopic) will be used. The model involves the creation of a cylindrical bone defect (diameter 3 mm, depth 3 mm) by drilling into the femoral condyle bone from the knee joint. As such, a bone defect will be obtained characterised by trabecular bone.

The primary outcome parameters will be obtained following histological sectioning; within the sections, a region of interest (ROI) will be determined by imposing a circle with the same diameter as that of the original bone defect. Subsequently, the bone area and particle area will be determined histomorphometrically within this ROI. Additionally, the general tissue response and appearance will be evaluated by histological assessment via descriptive histology.

To study the bone forming capacity of (cell-laden) constructs, it is mandatory to implant such constructs ectopically (= outside native bone tissue). As such, the formation of bone tissue can be clearly attributed to the cells within the constructs, rather than to surrounding bone tissue when these constructs would be placed orthotopically (in a bone defect).

The primary outcome parameter is bone formation (yes/no) and histomorphometrical amount of formed bone (%bone tissue within the construct area). Additionally, histological assessment via descriptive histology will be used to identify the characteristics of both formed bone and tissue responses (e.g. angiogenic responses).

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

---

The animals will be anaesthetized ~30 minutes after administration of a painkiller and placed in dorsal position. When under full anaesthesia, a skin incision will be made in the knee area, after which the knee will be fully flexed. After incision of the fascia, the knee joint will be exposed, the patella will be pushed aside, and the femoral condyle will be used to drill a bone defect using sequential drilling with dental drills of increasing diameter (final diameter 3 mm). Then, the construct will be placed, the fascia will be closed, and finally the skin will be closed with a running intracutaneous suture. This procedure will be followed for both knees per animal.

While still fully anaesthetized, the animals will be placed in ventral position, after which 4 dorsal subcutaneous pockets will be created per animal (2 on each side of the spine) by blunt dissection. Then, constructs will be inserted into these pockets and the wound will be closed with a running intracutaneous suture.

The animals will be given painkillers pre- and post-surgery.

In order to be able to evaluate bone formation/regeneration at both an early and late stage after construct implantation, animals will be sacrificed after 4 and 12 weeks. These time points have been shown effective to determine histological aspects and histomorphometrical parameters in numerous previous publications using this animal model (van Houdt et al., Biomed Mater 2015; Alghamdi et al., Biomaterials 2014; Nejadnik et al., Biomaterials 2014; van de Watering et al., Biomed Mater 2013).

---

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

---

Sample size calculation for this experiment will be performed in line with the requirements of the Animal facility of Radboud University Nijmegen, and based on the existing literature and the experience of the research group. For this purpose the formula:  $n = 1 + 2 C (s/d)^2$  will be used.

Within this formula, standard deviation (s) and magnitude of the effect to be detected (d) will be implemented by reviewing the scientific literature on histomorphometric analysis of bone area with this implantation model. Typically, the number of required samples per experimental group ranges from 5 to 8 (using 7.85 as the C value; power 0.8 and level of significance 0.05).

---

## **B. The animals**

---

Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages. Provide justifications for these choices.

---

As the created bone defects will be filled with cell-laden constructs containing human cells, immune-compromised rats need to be used. The femoral condyle bone defect in rats is a well-described orthotopic implantation model that allows for accurate bone defect creation and subsequent filling of the defect with bone substitute material or cell-laden constructs.

In view of this, the animals to be used will be:

- rats (smallest mammals to reliably create bone defects)
- nude (immune-compromised to avoid undesired responses against human cells within the constructs)
- male (larger bones, hence larger femoral condyles for the creation of a 3 mm bone defect)

The choice is to use healthy, mature (9-week old), male, nude rats (CrI:NIH-Foxn1rnu).

The number of animals depends on the sample size calculation; with 6 experimental groups (see section 3.4.1) and typically 5-8 samples per group, the required maximum number of animals for 1 implantation period would be 24. As 2 implantation periods will be used (4 and 12 weeks) for both orthotopically and ectopically implanted constructs, the total number of animals will be 48.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
rat (CrI:NIH-Foxn1rnu)	charles river	-48	adult

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

The same animals will be used for subcutaneous implantation of the implants (ectopic implantation to study bone forming capacity).

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

#### Replacement

Biological processes, including bone formation and regeneration via (cell-laden) constructs, cannot be mimicked in cell culture or organ culture models. Consequently, laboratory animals are required to answer the scientific question as to what extent the different constructs studied in this experiment are capable to induce bone formation (ectopic implantation) and regenerate bone defects (orthotopic implantation).

The choice for (nude) rats is based on the well-described femoral condyle bone defect model in this species. As such, this species is the smallest mammalian animal to reliably create bone defects to study bone regeneration of non load bearing bone substitute materials/cell-laden constructs.

#### Reduction

The number of required animals will be based on a sample size calculation, which makes that the minimum number of animals to obtain useful scientific data will be determined. As such, no excess numbers of animals will be used nor will a too low number of animals be used that would make the outcome scientifically questionable. The number of laboratory animals required for this experiment are reduced as the animals will be used for



both ectopic and orthotopic implantation models. As such, the estimated number of required animals can be reduced to ~48 (i.e. ~24 per implantation period).

#### Refinement

All animal procedures will be performed under full anaesthesia and the animals will be given painkillers pre- and post-surgery. Additionally, the well-being of the animals will be individually monitored by checking animal behaviour, body weight, and the wound area.

Explain what measures will be taken to minimise 1) animal suffering, pain or fear and 2) adverse effects on the environment.

---

The animal procedures will be performed under full anaesthesia and the animals will be given painkillers pre- and post-surgery. Previous experiments using this implantation model have not shown any adverse effects or altered behaviour of the animals, for which it can be assumed that the model and measures to minimise adverse effects and animal discomfort are acceptable.

## Repetition and Duplication

### E. Repetition

---

Explain what measures have been taken to ensure that the proposed procedures have not already been performed. If applicable, explain why repetition is required.

---

Not applicable

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III of the Directive 2010/63/EU?

---

No

Yes > If this may adversely affect animal welfare, describe how the animals will be housed and provide specific justifications for these choices.

---

### **G. Location where the animals procedures are performed**

---

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

---

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

---

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

---

## **Classification of discomfort/humane endpoints**

### **H. Pain and pain relief**

---

Will the animals experience pain during or after the procedures?

---

No > Continue with question I.

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

---

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

---

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

---

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

---

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

---

Numerous previous animal experiments using this implantation model have shown negligible chances on adverse effects on animal welfare. Additionally, the number of drop-outs due to the proposed implantation models has shown to be negligible.

Explain why these effects may emerge.

---

Normal recovery from the surgery can be expected.

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

---

Animals will receive appropriate anesthesia and analgesia.

### **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

Since no clinical effects are to be expected, apart from normal recovery of the surgery, the general humane endpoints apply:

Criteria for application of a humane endpoint are:

- 1) The animal experiences more than little, additional, discomfort as a result of conditions not related to the experiment
  - 2) The animal experiences more discomfort than justified for the purpose of the experiment and weighed by the DEC
  - 3) (reliable and applicable) results cannot be achieved because of conditions not related with the experiment
  - 4) The objective of the experiment has been reached
- 

Indicate the likely incidence.

---

As numerous previous animal experimental work has utilised the proposed animal model (i.e. femoral condyle bone defect in rats) without any complications regarding (wound) infection or effect on animal behaviour, it is not expected that another humane endpoint than 'the objective of the experiment has been reached' will occur. As such, animals intended for implantation periods of 4 and 12 weeks will likely be sacrificed after completing their intended implantation period.

### **K. Classification of severity of procedures**

---

Provide information on the expected levels of discomfort and indicate to which category the procedures are assigned (non-recovery, mild, moderate, severe ).

---

Moderate

## End of experiment

### L. Method of killing

---

Will the animals be killed during or after the procedures?

---

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

---

At the end of the implantation period(s), implantation sites need to be harvested for histological and histomorphometrical analysis.

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

---

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

---

Yes

---



## Bijlage Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	90500	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	BioXpert B.V.	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	2	Effectiviteit en Veiligheid

*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.

Dit experiment zal tweeledig opgezet worden en derhalve zal voor elk deel de primaire uitkomst parameter verschillend zijn. Er is een kortlopende deel waarin virale replicatie zal worden gemeten als parameter voor veiligheid en een langlopende deel waarin naar de klinische verschijnselen als parameter voor effectiviteit gekeken zal worden. In eerste instantie zullen alle dieren binnen 1 groep eenzelfde behandeling ondergaan, echter zal de looptijd van de studie verschillend zijn voor verschillende dieren binnen deze groep. Per virus zullen vier doseringen van de behandeling meegenomen worden in beide experimenten.

Eerdere experimenten uitgevoerd door de opdrachtgever hebben aangetoond dat de hoogste dosering (20 mg/kg intraveneus) bescherming biedt tegen infectie en ziekte. Indien het fenomeen van ADE (antibody dependent enhancement) aanwezig is zal de verwachting zijn dat één of meerdere lage doseringen (welke suboptimaal de infectie kunnen neutraliseren) geassocieerd zullen zijn met verergering van ziekte (ADE). Daarnaast wordt in deze studie ook gekeken naar de effectiviteit van het preparaat (met name of lagere concentraties van het antilichaam ook bescherming kunnen bieden en dus gedacht kan worden aan dose-sparing). Vandaar dat de volgende aflopende reeks van concentraties uitgetest zal worden:

20 mg/kg, 2 mg/kg, 0.2 mg/kg en 0.02 mg/kg.

Gestart wordt met 30 dieren per groep waarbij in de tijd wordt opgesplitst in 2 delen: deel 1 veiligheid (n=10) en deel 2 effectiviteit (n=20).

Aangezien het hier een tweeledige studie betreft naar zowel effectiviteit en veiligheid, maar van tevoren niet bekend is welke doseringen dit zullen zijn zal zowel in de hoge als de lage regionen twee doseringen meegenomen worden. Ter controle zal voor beide virussen een niet specifieke antilichaam preparaat (isotype controle) meegenomen worden in de hoogste en laagste dosering. Deze isotype controle zal dienen als negatieve controle op het toedienen van een preparaat na infectie.

#### Deel 1: Veiligheid

n=10 per behandelingsgroep zal op de piek van de virus replicatie (zoals bepaald in experiment 1 "Time Course") uit de studie worden gehaald en bij deze dieren zal de primaire uitkomst parameter virale load in longen zijn: verhoging in het geval van antilichaam afhankelijke verergering van ziektebeeld (ADE: antibody dependent enhancement) in vergelijking met dieren behandeld met het isotype controle preparaat. Het tijdstip van de piek van de virale load zal in beide gevallen gelijk zijn aan de piek die gevonden is in de Time Course.

## Deel 2: effectiviteit

De resterende dieren van elke groep (n=20) zullen vervolgd worden gedurende 14 dagen waarbij de dagelijkse klinische score de primaire uitkomstparameter zal zijn.

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.

Dieren zullen op dag 0 intranasaal geïnfecteerd worden met ofwel muis-geadapteerd H1N1 ofwel muis-geadapteerd H3N2 influenza virus. Deze route is normaal ook de port-d'entree voor dit virus. Vervolgens zullen de dieren intraveneus behandeld worden met verschillende concentraties van het antilichaam preparaat of een isotype controle. Op dag X (zoals bepaald in experiment 1 "Time Course") zal een gedeelte van de dieren (n=5) binnen 1 groep geëthanaseerd worden voor het bepalen van de virale load. De overige dieren (n=20) zullen elke dag geobserveerd worden tot en met dag 14 na infectie, klinische score genoteerd worden en lichaamsgewicht gemeten worden. Op basis van het bereiken van het humane eindpunt zullen dieren vroegtijdig uit de studie worden gehaald.

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

In de voorbereidende experimenten (niet gekoppeld aan dit projectvoorstel) en experiment 1 "Time Course" zal onderzocht worden wat de optimale virale dosis is voor challenge en de optimale dag voor de piek van de replicatie. Resultaten in deze experimenten zullen als basis dienen voor het bepalen van de groepsgrootte van de dieren in Dierproef 2 "Effectiviteit en Veiligheid (ADE)".

Geschat aantal: 360 dieren en dit aantal is gebaseerd op de volgende aannames:

**Kortlopende deel (veiligheid) :** Aangezien dit het eerste experiment in de muis is dat onderzoek doet naar ADE (verhoging virale load en/of verhoging van pathologie) is het moeilijk/onmogelijk om in te schatten waarmee de ADE gecorreleerd is (maw welke mate van verhoging van 1 of beide parameters) en wat de verwachte standaard deviatie is van deze waarnemingen. Hierbij is de hypothese dat elke verhoging van virale load ten opzichte van de controle groep wordt geïnterpreteerd als ADE. Deze proef is niet eerder uitgevoerd, derhalve is het niet mogelijk om met behulp van een power berekening het aantal te bepalen en is de inschatting gemaakt hoeveel dieren er nodig zouden zijn om te komen tot significante verschillen (n=10). Mocht er binnen dierproef #1 wel een aanwijzing gevonden worden wat betreft spreiding tussen de groepen (een parameter die wel bepaald kan worden in tegenstelling tot het effect van ADE welke mogelijk als resultaat van dierproef #2 uit zal komen) zal dit meegenomen worden in een herziene groepsgrootte bepaling op basis van een adequate poweranalyse.

**Langlopend deel (effectiviteit)** In het langlopende deel van de studie zal de primaire uitleesparameter de klinische observaties zijn aan de hand van de scoringstabel en de groepsgrootte is bepaald met behulp van de Fischer's exact test. Indien een schatting wordt gedaan van het behandelingseffect in de behandelde groepen van 50% (dieren die score 2 of minder hebben) ten opzichte van de controle groep en 1 outlier binnen de controle groep (= een dier in de controle groep dat niet ziek wordt zijnde 5.5%) kan met een power berekening (alpha van 5% en power van 80%) bepaald worden dat er een minimale groepsgrootte nodig is van n=20 om tot significante verschillen te komen (zie onderstaande tabel). Totaal aantal van 240 dieren.

Behandeling	Controle	N
70%	0%	8
60%	0%	10
50%	0%	12
70%	8.3%	12
60%	6.6%	15
50%	5.5%	20

De resulterende Kaplan-Meier curves welke gegenereerd kunnen worden uit de resultaten van het langlopende deel (effectiviteit) zullen gebruikt worden om te bepalen of er significante verschillen zijn tussen de verschillende behandelingen en de isotype controle groepen.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: vrouwelijke CD-1 muizen.

Experiment 2 zal gericht zijn op het wel of niet induceren van ADE. Voor de bestudering hiervan dient een muizenstam gebruikt te worden met een compleet immuunsysteem, aangezien het immuunsysteem een grote rol speelt in het proces van ADE. Voor de studie naar ADE dient een zo wild-type mogelijk immuunsysteem beschikbaar te zijn. In het algemeen kunnen inteelt muizenstammen vanwege hun inteelt-karakter deficiënt zijn op 1 of meerdere vlakken van het immuunsysteem en derhalve minder geschikt om een dergelijk complex systeem als het immuunsysteem te bestuderen (het is nog steeds niet volledig bekend welke deficiënties een invloed hebben op zowel het aspecifieke als adaptieve deel van het immuunsysteem). Outbred muizen daarentegen kunnen worden gezien als immuuncompetente muizen en zijn dan ook beter geschikt om dit soort experimenten uit te voeren. Daarnaast zijn in de literatuur meerdere studies beschreven voor andere virale infecties met onder andere Dengue virus en Ebola virus (Puerta-Guardo et al Journal of Virology 2013) en daarnaast is deze muizenstam ook gebruikt voor het genereren en uittesten van muis-geadapteerd influenza virus (Brown PNAS 2001). In deze experimenten zal gebruik gemaakt worden van vrouwelijke muizen om agressie binnen de groepen tot een minimum te beperken.

Herkomst: geregistreerde fokker in de EU

Levensstadium: 6-8 weken oud bij start van het experiment

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

Vervanging: deze dierproef is opgezet om de effectiviteit en veiligheid te bestuderen bij infectie met twee muis-geadapteerde influenza virussen. Een dergelijke studie is niet mogelijk in een in vitro model en derhalve is het niet mogelijk om dit in vitro uit te voeren. Wat betreft effectiviteit is het wel in vitro te meten of een bepaald antilichaam preparaat een neutraliserende werking heeft, maar voor het bestuderen van antilichaam afhankelijke verergering en werkzaamheid in vivo is een compleet immuunsysteem nodig en dit is niet na te bootsen in vitro.

Vermindering: Tijdens de studie zullen zo veel mogelijk parameters beoordeeld worden in deze studie (virologie, pathologie en klinische observaties), zodat zoveel mogelijk waarnemingen in één dier verkregen worden.

Verfijning: Meest invasieve handelingen (intranasale infectie en euthanasie) zullen uitgevoerd worden onder sedatie (isofluraan 3% / O2). Daarnaast zullen de dieren dagelijks gewogen worden. Deze observaties worden geïntensiveerd naarmate de klinische verschijnselen toenemen. Daarnaast zal een gedeelte van de

dieren (n=10 per groep) vroegtijdig uit de studie gehaald worden (op basis van de resultaten van experiment 1 "Time Course"). Ondanks het feit dat op dit tijdstip de virale load in de longen het hoogst zal zijn, zullen de klinische verschijnselen zich pas later manifesteren. Deze werkwijze zorgt ervoor dat de dieren in het kortlopende experiment geen ongerief zullen ondergaan.

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.

Zie hierboven bij verfijning. De kans op nadelige milieueffecten zal tot een minimum beperkt worden door het feit dat dieren gehuisvest zullen worden in HEPA gefilterde IVC bakken, handelingen uitgevoerd zullen worden in een veiligheidskabinet en afval (bedding, kadavers en andere materialen gebruikt in de studie) aangeboden zal worden voor destructie. De gehele studie wordt uitgevoerd onder BSL II ingeperkte condities.

## 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.

Met behulp van literatuur studie is gekeken of eerdere experimenten uitgevoerd zijn, waarin een dergelijke vraagstelling is bestudeerd. In de literatuur zijn meerdere studies beschreven waarin gekeken naar ADE, echter dit was in het kader van andere virale infecties dan influenza. Daarnaast betreft het hier een studie die vanuit regulatorisch oogpunt uitgevoerd dient te worden voordat het hier uit te testen antilichaam preparaat in een klinische studie uitgetest kan worden.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.



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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. kortademigheid en gewichtsverlies
2. Eventuele verwondingen door agressie binnen de groep. De kans hierop is klein, maar kan nooit uitgesloten worden.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Longontsteking door infectie met influenza
2. Gebruik van dieren die voorheen niet samen gehuisvest waren.

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

1. In het algemeen hebben analgetica (NSAID, aspirine of paracetamol) een onstekingsremmende werking en dergelijke bijverschijnselen zijn niet verenigbaar met het uitvoeren van infectie experimenten waarbij ook het immuunsysteem (wat betreft effectiviteit en veiligheid) deel uitmaakt van het proces.
2. Dieren zullen zover mogelijk besteld worden uit een grote batch die bij de fokker al in 1 groep gehuisvest waren. Daarnaast zullen de experimenten uitgevoerd worden met vrouwelijke dieren, aangezien agressie onderling minder aannemelijk is dan bij groepshuisvesting van mannelijke dieren.

### **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.

De dieren zullen dagelijks geobserveerd worden op de volgende criteria en bij matig (klinische score 3: kort lopende experiment) of ernstig ongerief (klinische score 4: lang lopende experiment) uit de proef worden gehaald door middel van euthanasie:

- 0. Geen klinische verschijnselen (geen ongerief)
- 1. Ruwe vacht (gering ongerief)
- 2. Ruwe vacht, verminderd alert, passief bij handelingen (gering ongerief)
- 3. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, passief bij handelingen (matig ongerief)
- 4. Ruwe vacht, ineengedoken, bemoeilijkte ademhaling, lethargisch (ernstig ongerief).

Een humane eindpuntsscore van 4 komt overeen met ernstig ongerief. Daarnaast zullen de observaties geïntensiveerd worden bij humane eindpuntsscore 3 van 1x per 24 uur naar minimaal 1x per 12 uur. Dit geïntensiveerd protocol zorgt ervoor dat dieren nooit langer dan 12 uur het maximale ongerief zullen ondergaan. Daarnaast zullen de dieren uit de proef gehaald worden als de dieren niet meer zelfstandig water en/of voer tot zich kunnen nemen.

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

Voor de dieren die vroegtijdig uit de studie gehaald worden voor het bepalen van de virale load op dag X zal de kans op het ontstaan van matig of hoger ongerief (score 3 en 4) niet aanwezig zijn en derhalve wordt het ongerief vantevoren ingeschat op gering (score 1 of 2) voor 100% van de dieren. Voor de dieren die de volledige looptijd van de studie doorlopen (14 dagen) kan er ernstig ongerief optreden als gevolg van afwezigheid van effectiviteit met inschatting van gering in 17% van de dieren (hoogst gedoseerde groepen), ernstig in 50% van de dieren (laagst gedoseerde groepen en controle groepen) en matig in de resterende 33% van de dieren.

### **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.

Op basis van de hierboven beschreven negatieve effecten zal het cumulatieve ongerief ingeschaald worden op gering (klinische score 1 of 2) voor het kortlopende experiment en ernstig (klinische score 4) voor het langlopende experiment.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Dieren zullen worden gedood om vervolgens de virale load in de longen te bepalen. Deze bepaling is niet mogelijk bij het in leven blijven van de dieren. De dieren die de volledige looptijd doorlopen zullen geëuthanaseerd worden om met behulp van (immuno)histochemie te kijken naar de pathologie in de longen.

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



7

30 JUN 2015

## 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?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 90500  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie	BioXpert B.V.
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
KvK-nummer	54838134

- 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	Nistelrooise Baan	3
Postbus		
Postcode en plaats	5374RE	Schaijk
IBAN	NL72RABO0183605888	

- 1.4 Vul de gegevens in van 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]	

- 1.5 (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]	

- 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 | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     | [REDACTED] |   |
| Afdeling                    | [REDACTED] |   |
| Telefoonnummer              | [REDACTED] |   |
| E-mailadres                 | [REDACTED] |   |
- 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 - 7 - 2015 |
| Einddatum  | 1 - 7 - 2017 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar de werkzaamheid en veiligheid van een medicijn tegen infectie met influenza virus in muizen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                       |
|-------------|-----------------------|
| Naam DEC    | Stichting DEC consult |
| Postadres   |                       |
| E-mailadres | [REDACTED]            |

## 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.  Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

Projectvoorstel

Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

Melding Machtiging

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Schaijk

Datum

25 - 6 - 2015

Handtekening



8

Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert BV

[Redacted]

Nistelrooise Baan 3

5374 RE SCHAIJK



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD905002015121

Datum 01-07-2015

Betreft Vervolg Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [Redacted]

Op 25 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen. met aanvraagnummer AVD905002015121. Uw aanvraag wordt in behandeling genomen. In deze brief leest u wanneer u een beslissing kunt verwachten.

#### **Wanneer een beslissing**

Wij nemen uiterlijk 20 augustus 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.

Gesproken met DEC en onderzoeker (indien geel gearceerd komt het antwoord van de onderzoeker)

Datum: 30 juni 2015

Over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121 hebben wij enkele vragen.

Zowel in Beschrijving Dierproeven 1 als 2 staat onder B uitleg over Experiment 2. Is dit de DEC opgevallen, of is de DEC van mening dat één van de teksten over dierproef 1 gaat?

→ Dierproef 1 is een vooronderzoek voor Dierproef 2. Daarom zijn voor beide proeven dezelfde dieren nodig en staat bij Dierproef 1 beschreven wat er bij Dierproef 2 (ook) nodig is.

Beide experimenten wil men uitvoeren met enkel vrouwelijke muizen, om agressie te voorkomen. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? De CCD staat gebruik van één van beide geslachten alleen toe als dit goed is onderbouwd. De CCD heeft eerder dergelijke onderbouwingen als onvoldoende bestempeld.

→ Een (stabiele) groep mannen kan in de loop van de proef toch gaan vechten. Door veranderingen in de conditie van de dieren (ze worden ziek in dit geval), vinden er opnieuw hiërarchische vechtpartijen plaats. Er moet dan besloten worden of alle groepen uit elkaar gehaald worden, of alleen de vechtende groep. Om deze extra variabele uit te sluiten, is gekozen voor alleen vrouwelijke muizen.

In beide dierproeven wordt gesproken over 'gering ongerief'. Dit is een term uit de oude wetgeving. Heeft de DEC dit opgemerkt, en hoe heeft de DEC dit naar de huidige wetgeving geïnterpreteerd?

→ De DEC heeft dit als 'licht ongericht' geïnterpreteerd

Bij Dierproef 1 worden dieren geëuthanaseerd als zij 'matig ongerief' ondervinden. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? Is de DEC van mening dat de term 'matig' overeenkomt met de huidige wetgeving, of een andere indeling? Wij zijn van mening dat matig ongerief

→ De term 'matig' komt overeen met de huidige wetgeving. Als de dieren uit Proef 1 matig ongerief ondergaan als gevolg van de infectie, wordt dit gezien als humaan eindpunt.  
 → Het matig ongerief komt niet voort uit de handelingen binnen de proef. Onvoorzien zou het wel kunnen, dan wordt er geëuthanaseerd. Het is niet de verwachting dat dieren matig ongerief krijgen.

Het aantal dieren in Dierproef 2 is niet heel helder beschreven. Kon de DEC de berekening van de aanvrager volgen?

→ 30 dieren per groep x 12 groepen.  
 groepen: er zijn 4 doseringen x 2 virussen = 8 groepen  
 controlegroep per virus voor hoogste en laagste dosis (= 2 virussen x 2 doses) = 4 groepen





**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 3 juli 2015 15:03  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: Vraag AVD905002015121

Beste [REDACTED] Geachte leden van de CCD,

Er is geen specifieke reden om voor een bepaald geslacht te kiezen in deze experimenten, echter het kiezen van een bepaald geslacht heeft een aantal consequenties op het verloop van de studie met betrekking tot:

- Bruikbaarheid van gegevens in voorbereidende studies: in deze studies is de infectie dosis bepaald van de twee benoemde influenza virussen in vrouwelijke muizen. Voor extrapolatie van de gegevens van deze studies naar het huidige projectvoorstel is het noodzakelijk om in het hoofdexperiment ook gebruik te maken van vrouwelijke dieren. Voorbereidend werk in een ander geslacht dan de hoofdstudie zou kunnen betekenen dat de gevonden dosis in het voorbereidend werk niet leidt tot bruikbare resultaten in de studies beschreven in het huidige projectvoorstel.
- Daarnaast betreffen het in het hoofdproject infectie experimenten welke onder klasse II inperking uitgevoerd dienen te worden. Indien agressie (waarop de kans bij huisvesting van mannelijke dieren groter is dan bij vrouwelijke dieren) optreedt binnen de groep, dienen de dieren van die groep gesplitst te worden. Praktisch gezien is dit niet mogelijk in de huidige opzet (klasse II inperking door middel van IVC huisvesting) met deze aantallen dieren. Daarnaast levert solitair huisvesten van muizen ook ongewenst ongerief op.

Deze dieren worden verkregen van een commerciële leverancier en de aantallen zullen niet leiden tot opvoeren van de fok. Derhalve zal het gebruik van dit relatief kleine aantal dieren niet leiden tot meer surplus mannelijke dieren.

Met vriendelijke groeten, [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

The Netherlands

[REDACTED]

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** vrijdag 3 juli 2015 11:56  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** Vraag AVD905002015121

Geachte meneer [REDACTED],  
Over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121 hebben wij een vraag.

In uw aanvraag geeft u aan alleen vrouwelijke muizen te willen gebruiken. De CCD stuurt actief op het voorkomen van in voorraad gedode dieren. Kunt u aantonen dat het aldus gecreëerde aantal surplusdieren van het andere geslacht niet in voorraad gedood zal worden? Als u dit inderdaad kan aantonen vragen wij u dit te beargumenteren.

Om uw aanvraag in de volgende vergadering te kunnen bespreken, vraag ik u uiterlijk woensdag 8 juli te antwoorden.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
**Centrale Commissie Dierproeven**



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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

BioXpert B.V.

Nistelrooise Baan 3  
5374RE SCHAIJK

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD905002015121

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 13 juli 2015

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer/mevrouw,

Op 25 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 30 juni 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Overige vragen zijn beantwoord door de onderzoeker.

**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 "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 juli 2015 tot en met 1 juli 2017.

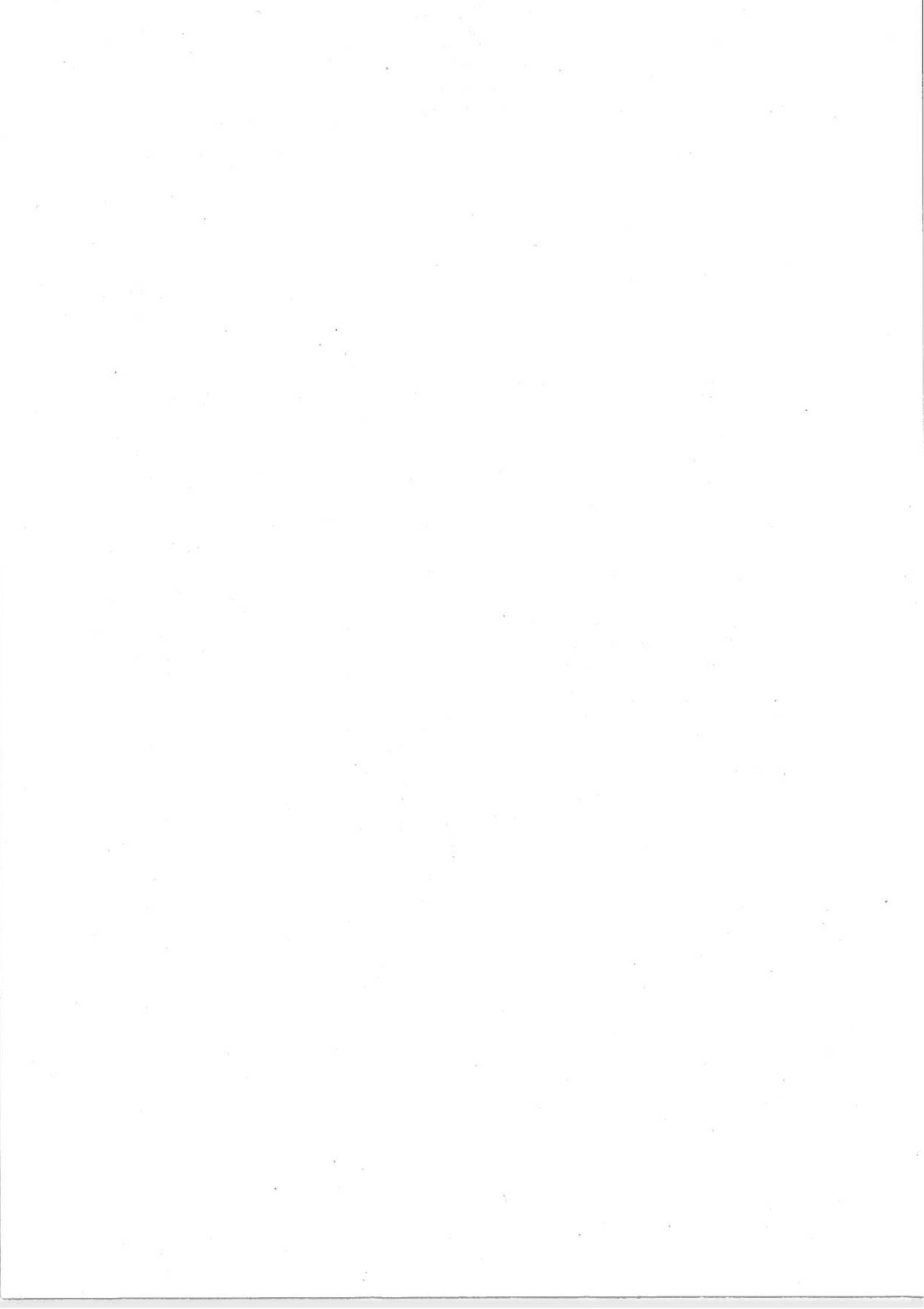
Omdat het hier de afronding van een project betreft, gaat de CCD akkoord met het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Een nieuw project zal met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd moeten worden.

**Beoordeling achteraf**

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1 lid 1d en lid 3 van de Wet op de dierproeven. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-Consult 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 het 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- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.

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

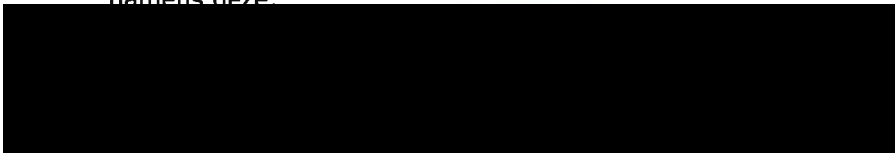
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

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: - DEC-advies  
- Weergave wet- en regelgeving





## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: BioXpert B.V.  
Adres: Nistelrooise Baan 3  
Postcode en woonplaats: 5374RE SCHAIJK  
Deelnemersnummer: 90500

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 juli 2015 tot en met 1 juli 2017, voor het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Consult.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, waarvan het ondertekende exemplaar is ontvangen op 30 juni 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 26 juni 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 26 juni 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, ontvangen op 25 juni 2015

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Time Course	Muizen	120	Licht
Effectiviteit en Veiligheid	Muizen	360	33% Licht 66 % Ernstig

Na afloop van dit project wordt een beoordeling achteraf uitgevoerd. Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2017 plaatsvinden.





## **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.

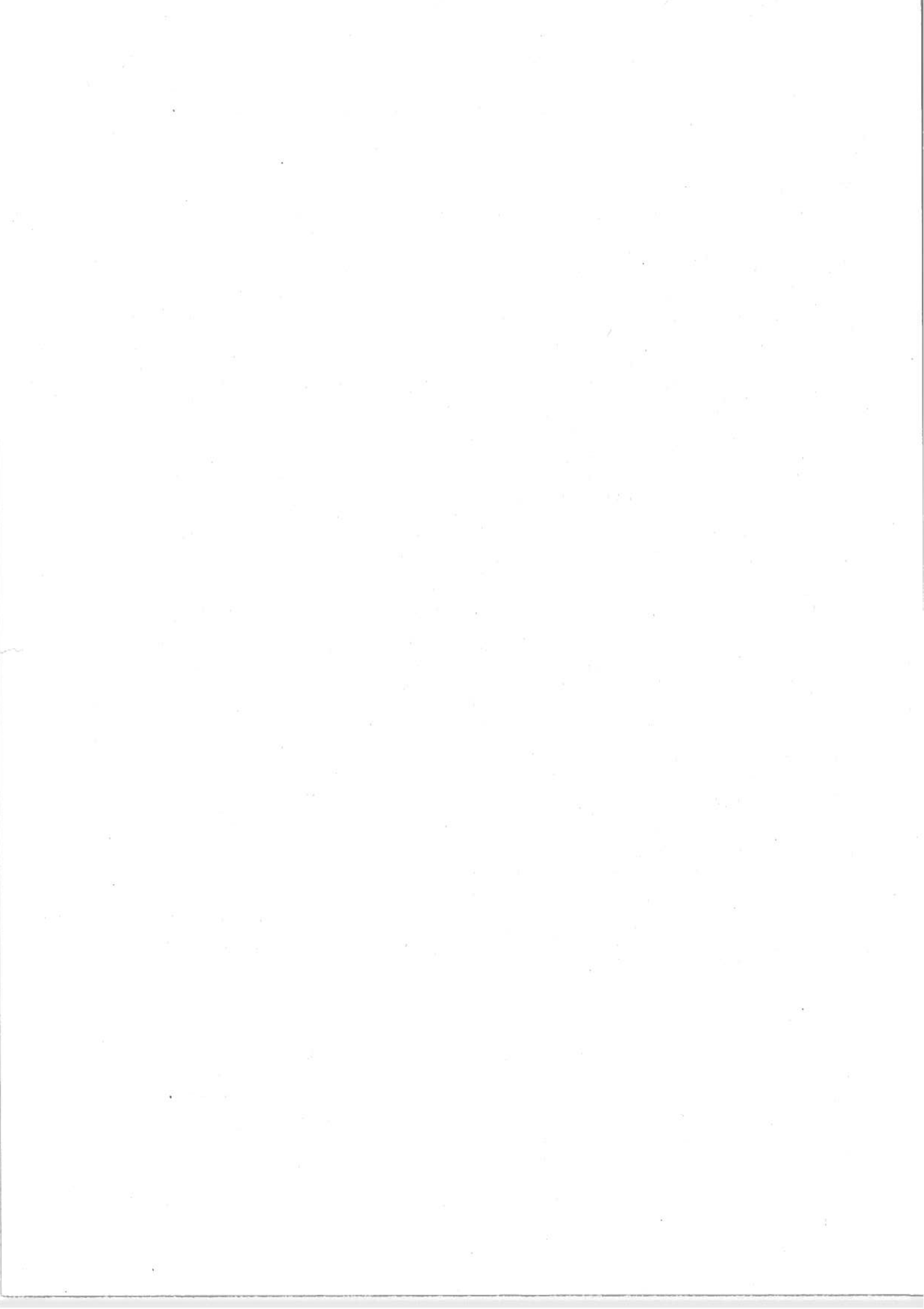
Voordat een dierproef die onderdeel uitmaakt van dit project start, moet volgens artikel 10a3 van de wet de uitvoering afgestemd worden met de instantie voor dierenwelzijn.

### **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 blijvende schade



**Datum**

13 juli 2015

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD905002015121

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.

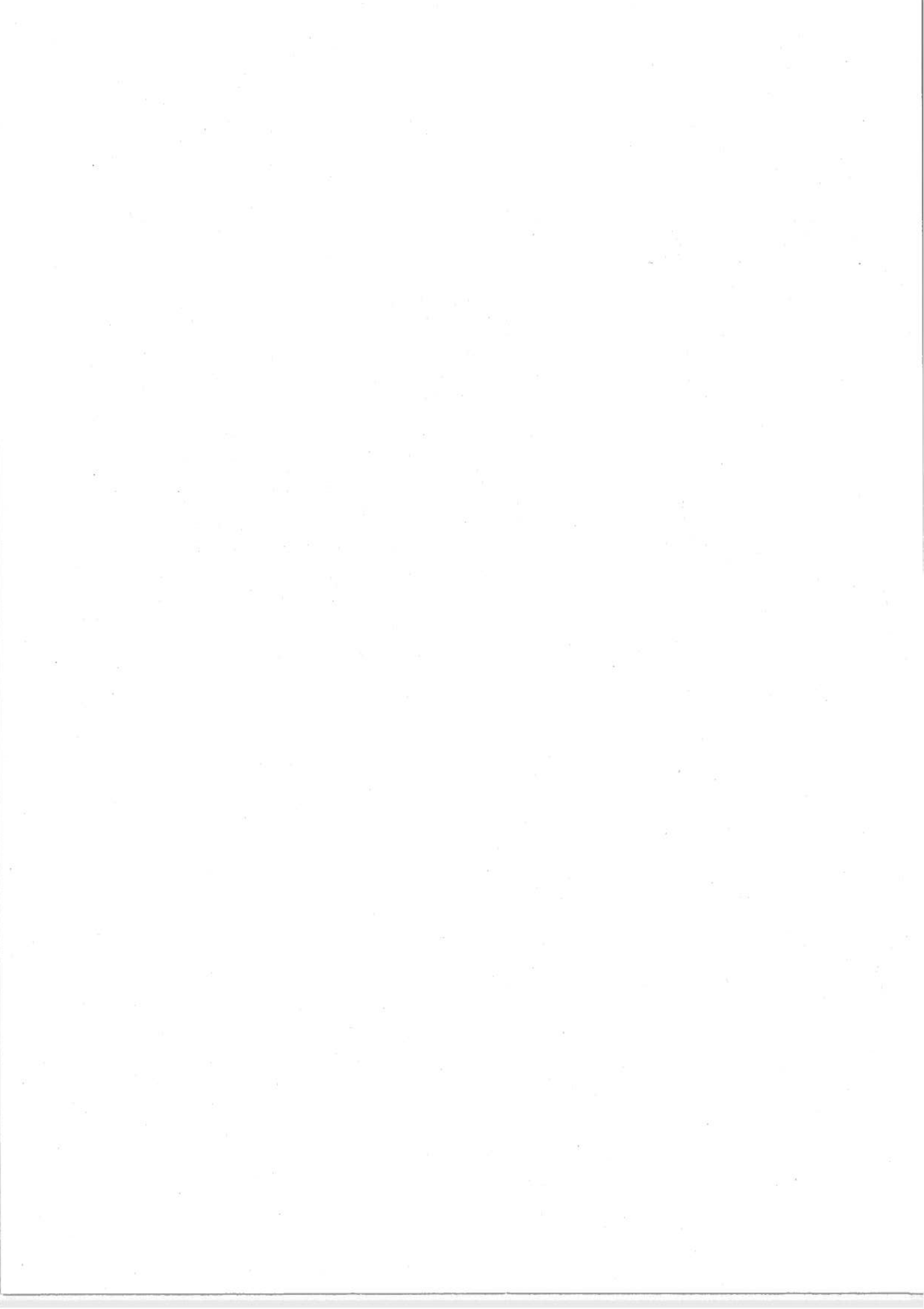
Uit artikel 13c volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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.

**Beoordeling achteraf**

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk oktober 2017 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 30 juni 2015 13:04  
**Aan:** [Redacted]  
**Onderwerp:** Vragen AVD905002015121

Geachte meneer, mevrouw,

Over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121 hebben wij enkele vragen.

Zowel in Beschrijving Dierproeven 1 als 2 staat onder B uitleg over Experiment 2. Is dit de DEC opgevallen, of is de DEC van mening dat één van de teksten over dierproef 1 gaat?

Beide experimenten wil men uitvoeren met enkel vrouwelijke muizen, om agressie te voorkomen. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? De CCD staat gebruik van één van beide geslachten alleen toe als dit goed is onderbouwd. De CCD heeft eerder dergelijke onderbouwingen als onvoldoende bestempeld.

In beide dierproeven wordt gesproken over 'gering ongerief'. Dit is een term uit de oude wetgeving. Heeft de DEC dit opgemerkt, en hoe heeft de DEC dit naar de huidige wetgeving geïnterpreteerd? Bij Dierproef 1 worden dieren geëuthanaseerd als zij 'matig ongerief' ondervinden. Heeft de DEC hierbij stilgestaan? Is de DEC van mening dat de term 'matig' overeenkomt met de huidige wetgeving, of een andere indeling? Wij zijn van mening dat matig ongerief

Het aantal dieren in Dierproef 2 is niet heel helder beschreven. Kon de DEC de berekening van de aanvrager volgen?

Omdat de CCD deze aanvraag graag in de volgende vergadering wil beoordelen, vraag ik u vandaag een reactie te sturen. Voor vragen die u niet kunt beantwoorden, zal ik contact opnemen met de onderzoeker. Ik heb geprobeerd u zojuist te bellen, maar kreeg u helaas niet te pakken. Ik zal later vandaag nogmaals proberen te bellen.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
**Centrale Commissie Dierproeven**



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

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 30 juni 2015 14:58  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Vragen AVD905002015121

Geachte meneer, mevrouw,

Telefonisch hebben wij contact gehad over enkele vragen betreffende het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121.

Er zijn twee vragen die ik aan de onderzoeker gesteld heb, hij ontvangt een cc van dit bericht. Zoals afgesproken een terugkoppeling van de antwoorden.

Zowel in Beschrijving Dierproeven 1 als 2 staat onder B uitleg over Experiment 2.

Dierproef 1 is een vooronderzoek voor Dierproef 2. Daarom zijn voor beide proeven dezelfde dieren nodig en staat bij Dierproef 1 beschreven wat er bij Dierproef 2 (ook) nodig is.

Het aantal dieren in Dierproef 2 is niet heel helder beschreven.

Het gaat in totaal om 360 dieren.

Er zijn 30 dieren per groep, waarbij 10 dieren voor deel 1 en 20 dieren voor deel 2 gebruikt worden.

Er zijn 12 groepen: 4 doseringen x 2 virussen = 8 groepen

controlegroep: 2 virussen x 2 doses (hoogste en laagste dosis) = 4 groepen

8 + 4 = 12 groepen

12 groepen x 30 dieren = 360 dieren

Hiermee zijn de vragen beantwoord.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
**Centrale Commissie Dierproeven**

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

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

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 17 juli 2015 9:48  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling AVD905002015121

Geachte DEC Consult,

U heeft advies uitgebracht over het project "Onderzoek naar de effectiviteit en veiligheid van een universeel antilichaam preparaat tegen infectie met influenza virus in muizen" met aanvraagnummer AVD905002015121. Wij danken u voor uw advies, en koppelen graag het oordeel van de CCD over deze aanvraag aan u terug.

De CCD heeft besloten de vergunning, overeenkomstig uw advies, te verlenen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht. Omdat het hier de afronding van een project betreft, gaat de CCD akkoord met het gebruik van enkel vrouwelijke dieren. Een nieuw project zal met zowel mannelijke als vrouwelijke dieren uitgevoerd moeten worden.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

Met vriendelijke groeten,  
**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

0900 – 28 000 28 (10 ct/min)



1

## 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.
- 

#### AANLEIDING

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige, progressieve en irreversibele longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodelering, welke uiteindelijk leidt tot progressieve obstructie van de long arteriolen. Het histologisch beeld van de vaatlaesies in PAH is inmiddels goed in kaart gebracht, maar het onderliggende mechanisme wordt nog onvoldoende begrepen.

PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een congenitale hartafwijking (PAH-CHD). Het is bekend dat correctie van deze hartafwijking in een vroeg (reversibel) stadium van de ziekte kan leiden tot volledig klinisch herstel en regressie van de vaatlaesies. Te late correctie, in een irreversibel stadium van de ziekte, kan echter leiden tot versnelde ziekteprogressie en de dood. Het is voor de keuze en timing van interventie in PAH-CHD daarom essentieel de progressie en het stadium van de ziekte goed in kaart te brengen. Huidige diagnostische technieken blijken echter nog onvoldoende betrouwbaar om het onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele PAH, en zijn bovendien invasief en belastend voor het (jonge) kind.

Wanneer PAH-CHD irreversibel is, is longtransplantatie (LTx) momenteel de enige mogelijkheid tot genezing. Huidige behandelstrategieën kunnen de ziekteprogressie slechts vertragen, maar niet volledig stoppen of omkeren. PAH-CHD is hiermee nog steeds een dodelijke ziekte die al op jonge leeftijd kan leiden tot rechter hart falen (RHF) en de dood.

Samengevat: Er is nog onvoldoende kennis over de mechanismen van (de progressie van) longvaatremodelering in PAH-CHD. We kunnen de ziekteprogressie bovendien nog niet betrouwbaar volgen in de individuele patiënt en weten niet wanneer de ziekte irreversibel is. De progressie van irreversibele PAH-CHD, evenals alle andere vormen van PAH, kan momenteel slechts beperkt worden vertraagd, en niet worden genezen.

#### ACHTERGROND

PAH uit zich meestal al op jonge leeftijd en de gemiddelde levensverwachting is momenteel 3-5 jaar. PAH kent verschillende oorzaken: erfelijk, medicatie/toxinegeïnduceerd of als complicatie van aangeboren hartafwijkingen (CHD) of infecties zoals HIV; soms blijft de oorzaak onbekend. Alle vormen van PAH worden gekenmerkt door eenzelfde patroon van progressieve en irreversibele vaatafwijkingen in de longarteriën, welke zorgen voor een stijging van de longvaatdruk en weerstand. Het klinisch probleem dat PAH momenteel geeft is tweeledig: Het primaire ziekteproces (vasculaire remodeling) kan 1) onvoldoende betrouwbaar worden beoordeeld en 2) slechts beperkt worden geremd. De sleutel in het oplossen van dit probleem ligt primair in het beter begrijpen van de mechanismen betrokken bij de progressie en reversibiliteit van vasculaire remodeling in PAH.

PAH-CHD, of flow-PAH is een ideale subklasse van PAH om ziekteprogressie en reversibiliteit te onderzoeken door 2 unieke eigenschappen:

---

- 1) PAH-CHD is de enige vorm waarbij we de pathogene trigger kennen en kunnen kwantificeren.
- 2) PAH-CHD is de enige vorm die een reversibele fase kent.

1) De vaatafwijkingen in PAH-CHD ontwikkelen als gevolg van een toegenomen of abnormale flow en druk in de pulmonale circulatie, die voorkomt bij veel aangeboren hartafwijkingen. Eerder in ons lab is in ratten aangetoond dat een toegenomen pulmonale flow leidt tot verdikking van de spierlaag (mediahypertrofie) om de longarteriën (vroeg stadium PAH). Bij ziekteprogressie zien we dat ook de endotheellaag (intima) gaat verdikken, waardoor het vat dichtgroeit (neo-intimalaesie, eind stadium PAH) [van Albada, Dickinson, resp. 2008, 2011].

De meest ingrijpende veranderingen op cellulair niveau vinden plaats in de endotheelcellen van deze (neo)intima. [redacted]

2) Ook een reversibele fase is vooralsnog uniek voor PAH-CHD. Het normaliseren van abnormale pulmonale hemodynamiek (de trigger), door het corrigeren van het hartdefect, kan in een vroeg, reversibel stadium PAH leiden tot regressie van de vaatafwijkingen en volledig klinisch herstel. Wanneer de correctie van het hartdefect plaatsvindt in het irreversibele stadium, zal de longvaatziekte desondanks voortschrijden. Deze laatste groep kinderen blijkt een nog slechtere prognose te hebben dan wanneer het hartdefect open gelaten wordt. Beter begrip van het effect van hemodynamische normalisering op de pulmonale vaatremodelering in verschillende ziektestadia kan helpen in het ontrafelen van de mechanismen die specifiek betrokken zijn bij reversibiliteit. Dit voorkomt dat kinderen met PAH-CHD onterecht niet of wel worden geopereerd. Tevens kan dit leiden tot nieuwe targets voor farmacologische interventie in PAH-CHD en mogelijk in alle overige vormen van PAH.

Essentieel voor de timing van deze farmacologische interventie (in PAH) of van hemodynamische normalisatie (in PAH-CHD), is dus een betrouwbare inschatting van het ziektestadium. De beoordeling hiervan wordt momenteel gemaakt op basis van een combinatie van klinische parameters en hemodynamische onderzoeken zoals echografie en rechter hart katheterisatie. Geen van deze technieken kan echter betrouwbare informatie geven over het primaire ziekteproces en haar reversibiliteit. PET-CT onderzoek zou een mogelijkheid kunnen bieden om vaatremodelering in vivo in beeld te brengen. De eerste studies met de conventionele 18F-FDG PET tracer in PAH zijn reeds gepubliceerd [marsboom, zhao, resp. 2011, 2014] en geven aanleiding tot het testen van nieuwe PET tracers, specifiek voor vasculaire remodelering.

#### VOORGAAND ONDERZOEK:

Er is reeds 10 jaar ervaring met diermodellen voor PAH-CHD op de afdeling CCH-UMCG [van Albada, Dickinson 2005-2014]. [redacted]

[redacted] De klinische, hemodynamische en histologische progressie van flow-PAH is inmiddels goed in kaart gebracht. [redacted]

[redacted] Vroeg stadium MCT/flow-PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door geïsoleerde mediahypertrofie en een slanke intimalaag met kenmerken van hyperproliferatie en verhoogde apoptose. Gevorderd stadium PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door mediahypertrofie en een verdikte (neo)intima laag, met kenmerken van apoptose-resistentie. Beide fasen zijn overeenkomstig met de humane PAH-CHD. Dit model (Ia) wordt nogmaals beschreven onder paragraaf 3.4.2.

#### Context

Centraal bij dit onderzoek staat het doel om de prognose en kwaliteit van leven van patiënten met PAH te verbeteren. [redacted]



Het doel van dit project is globaal in te delen in 3 hoofdpeilers:

1. Het ontrafelen van de pathobiologie van PAH, zowel op genetisch, moleculair, cellulair, histologisch niveau. En specifiek: karakteriseren van de rol van de TGF- $\beta$  / BMP-as in respons op veranderingen in druk en flow.
2. Het karakteriseren van Reversibiliteit in PAH-CHD. Wat is het effect van normalisering van de pulmonale hemodynamiek op PAH longen; en tot welk tijdstip is de ziekte nog reversibel? Is er een point of no return? Wat zijn de mechanismen die hierbij een rol spelen?
3. Het ontdekken van nieuwe strategieën om de ziekte invasief en non-invasief te kunnen volgen en te stadiëren door het zoeken naar nieuwe biomarkers en toepassen van in vivo imaging technieken als PET-CT.
4. Farmacologische interventie op pathogene targets gevonden onder doel 1 en 2, die kunnen leiden tot een nieuwe behandeling voor PAH.

AD 1. Om de pathobiologie van PAH te ontrafelen zijn we van plan endotheelcellen te isoleren uit het MCT/flow-ratmodel (model Ia, paragraaf 3.4.2.) in verschillende stadia van de ziekte. [REDACTED]

[REDACTED] die specifiek aangrijpen op het veranderde fenotype dat de endotheelcel heeft verkregen tijdens ziekteprogressie.

Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Het weefsel en bloed dat niet gebruikt wordt voor de endotheelcelisolatie, wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. [REDACTED]

AD 2. Om de reversibiliteit van flow-PAH te onderzoeken zijn we momenteel bezig een model te ontwikkelen voor hemodynamische normalisatie in verschillende stadia van de ziekte. (model II, paragraaf 3.4.2.). [REDACTED]

[REDACTED] Dit simuleert de situatie van het sluiten van een hartdefect bij kinderen met PAH-CHD, waarbij de ziekte soms regressief en soms progressief is. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. Specifiek [REDACTED]

AD 3. We hebben als doel het primaire remodeleringsproces in de longvaten bij ratten met verschillende stadia van PAH minimaal invasief en in vivo in beeld te brengen. We zullen hiertoe minimaal 2 PET-tracers testen in het bekende MCT/Flow ratmodel. (model Ia en Ib, paragraaf 3.4.2.) We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden. [REDACTED]

Het bloed dat gestandaardiseerd verzameld wordt in alle dierproeven in de context van PAH zal gebruikt worden om nieuwe bloed biomarkers te vinden die in relatie staan tot de functionele en structurele veranderingen in het pulmonale vaatbed, of het collateraal aangedane rechter ventrikel.

AD 4. De studies uit doel 1 en de nationale samenwerkingen binnen het PHAEDRA consortium hebben als doel nieuwe targets te vinden voor de behandeling van PAH. Er wordt momenteel een grootschalige drugscreen uitgevoerd om te evalueren of al bestaande farmaca toegepast zouden kunnen worden in de behandeling PAH. [REDACTED] We hebben hier als doel het gekozen farmacon in vivo te testen in het MCT/flow ratmodel (model Ia en b), zowel preventief als bij gemanifesteerde ziekte. Tevens beogen wij het farmacon te testen in het transplantatiemodel (model II) beschreven onder doel 1b (als add-on therapie naast hemodynamische normalisatie). Er is binnen onze onderzoeksgroep reeds ervaring met het geven van therapie in ratmodellen voor PAH via verschillende toedieningswijzen (Dickinson 2011, 2014).

Voor de uitvoering van deze doelen zijn de volgende specifieke elementen nodig:

1. Een ratmodel voor PAH ontwikkeling als gevolg van een verhoogde pulmonale flow. Een model voor flow-PAH is reeds geoptimaliseerd in de wistar rat, gestandaardiseerd en gekarakteriseerd per ziektefase. [van Albada: Eur resp J 2005, Dickinson: Am J Pathol 2011, Circ res 2014] (model I paragraaf 3.4.2.). In dit model kunnen pathobiologische mechanismen worden onderzocht, kunnen PET-tracers worden getest en kan farmacologische interventie worden toegepast. (model Ia)
2. Een methode om endotheelcellen te isoleren uit rattenlongen met verschillende PAH stadia. Deze methode is reeds geoptimaliseerd.
3. Een methode om tracers te testen in ratten. Het UMCG beschikt over een geavanceerd micro-PET centrum en veel ervaring in de uitvoering van studies met radioactieve tracers in proefdieren.
4. Een ratmodel voor flow-PAH, geschikt voor de transplantatiestudies (doel 1b). Het MCT/Flow model is reeds gekarakteriseerd in de Lewis rat: een inbred rat welke, in tegenstelling tot de Wistar rat, gebruikt kan worden voor transplantatie. (model Ib onder paragraaf 3.4.2.)
5. Een ratmodel voor flow-PAH reversibiliteit. (model II, paragraaf 3.4.2.). Hierbij wordt een PAH-long, (PAH opgewekt in model Ib (element 4)), getransplanteerd in een gezonde ontvanger. [REDACTED]. In dit model kunnen pathobiologische mechanismen specifiek voor reversibiliteit worden onderzocht, kunnen PET-tracers worden getest en kan farmacologische interventie worden toegepast.

Het onderzoek vindt plaats op de afdeling Experimentele Cardiologie [REDACTED]). Hier is uitgebreide expertise in het onderzoeken van cardiovasculaire veranderingen in kleine proefdieren. We kunnen hartfunctie o.a. onderzoeken d.m.v. electrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Daarnaast hebben we een breed scala aan (immuno)histochemische en moleculaire technieken tot onze beschikking om veranderingen tot in alle details te onderzoeken. Voor het uitvoeren van deze specialistische ingrepen hebben we een zeer ervaren biotechnicus op onze afdeling en het centraal dierproef laboratorium (CDL) heeft een microchirurgisch team dat ons hier ook in bijstaat.

### 3.3 Belang

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

**MAATSCHAPPELIJK BELANG:** Dit onderzoek vormt een essentieel onderdeel van de PHAEDRA trial. PHAEDRA heeft als doel de toekomst van (jonge) kinderen en volwassenen met PAH te verbeteren, zowel wat betreft de levensduur als de kwaliteit van leven. PAH is een ziekte die zeldzaam is (2,3 per 1.000.000), maar een 5-jaarsoverleving heeft van <50%. Huidige behandelstrategieën kunnen het ziekteproces slechts remmen maar niet genezen. Onnauwkeurige stadiëring (inschatting van reversibiliteit) van het ziekteproces leidt in 2-8% van de patiënten met PAH-CHD tot onterechte sluiting van het hartdefect en daarmee tot een belangrijke verkorting van de prognose van het kind.

**WETENSCHAPPELIJK BELANG:** De proefdierstudies vormen een essentieel onderdeel van de overkoepelende PHAEDRA trial. Zonder deze studies kunnen de wetenschappelijke doeleinden van de gehele trial niet worden behaald. Specifiek zullen de resultaten die voortkomen uit dit project zullen binnen de PHAEDRA trial bijdragen aan:

- 1) Kennis van het mechanisme van ziekteontwikkeling en progressie in PAH (in CHD) en het effect van hemodynamische normalisatie hierop.
- 2) Nauwkeuriger diagnose en stadiëring bij patiënten met PAH, zodat behandeling beter kan worden gekozen en getimed. De alhier onderzochte diagnostische methoden zullen vervolgens in een ander onderdeel van de PHAEDRA trial in mensen worden getest.
- 3) Behandelstrategieën om PAH te voorkomen en te genezen. De farmacologische compounds gevonden in andere onderdelen van de PHAEDRA trial worden

binnen deze projectaanvraag in vivo getest.

Het wetenschappelijk en maatschappelijk belang van het onderzoek is ook gedetailleerd getoetst door (veelal internationale) reviewers bij het aanvragen van subsidie. Op dit moment is dat o.a. de volgende toegewezen subsidie:

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Er bestaat reeds een rat-model voor flow-PAH en RHF in ons lab.

Uit het bloed of weefsel van deze diermodellen kunnen we cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren.

Op deze modellen kunnen we diagnostische interventies toepassen, zoals bloedtesten, echografie, telemetrie, PET-CT, en hartcatheterisatie.

Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen, enerzijds chirurgisch (bijvoorbeeld longtransplantatie), anderzijds medicamenteus. Dit helpt ons aan de ene kant om de (ir)reversibiliteit van de geremodeleerde longvaten of rechter hartkamer te testen en te begrijpen wat voor mechanismen hier een rol in spelen, en ook om nieuwe medicijnen te ontwikkelen.

---

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

Onderzoeksstrategie.

Om de doelen zoals beschreven in paragraaf 3.2 te bereiken, zetten wij de volgende lijnen uit binnen dit project. De verschillende lijnen hangen sterk met elkaar samen.

1. Vasculaire celstudies: cellen geïsoleerd uit dieren met verschillende stadia van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia (flow-PAH in de wistar rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD) om de cellen uit te oogsten. De cellen kunnen we doorkweken om 1) gen- en eiwitexpressie te karakteriseren (o.a. Tgf- $\beta$ /BMP-as) en 2) farmacologische compounds te testen, die specifiek aangrijpen op het veranderde fenotype dat de endotheelcel heeft verkregen tijdens ziekteprogressie. Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Hieruit zullen een aantal potentiële farmaca volgen, waarvan de beste in vivo getest zullen worden in lijn 5.
2. Pathobiologiestudies. Ontrafelen van de mechanismen of factoren die ten grondslag liggen aan het ontstaan en de progressie van PAH. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia/b (flow-PAH in wistar en/of lewis rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD). Het weefsel en bloed van de ratten wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. Dit continueert reeds 10 jaar lopend onderzoek naar de pathobiologie van PAH in ons lab. Op basis van deze lijn zal tevens worden bepaald welke PET-tracers in lijn 4 gebruikt zullen worden. De aangrijppunten van de potentiële tracers zullen voorafgaand aan de experimenten in lijn 4 histologisch worden gevalideerd in het longweefsel uit deze lijn.
3. Reversibiliteitsstudies. Het karakteriseren van de (ir)reversibiliteit van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model II (PAH-LTx, een model voor het beloop van PAH-CHD na sluiten van de cardiale shunt cq. natuurlijk beloop van reversibiliteit van PAH-CHD). Verschillende stadia van PAH worden geïnduceerd in de ratten. [REDACTED]. De zieke longen komen

zo in een hemodynamisch genormaliseerde omgeving. Dit model bootst sluiting van de cardiale shunt na bij kinderen met PAH en een congenitale hartafwijking. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. De targets die specifiek geassocieerd zijn met regressieve / progressieve ziekte kunnen dienen als biomarker of als aangrijppunt voor farmacologische interventie, welke prospectief kunnen worden getoetst in lijn 5.

4. Imagingstudies. Imaging en stadiëring van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model I (flow-PAH) en later evt. model II (PAH-Ltx), waarbij de dieren in verschillende stadia van de ziekte een PET-CT scan krijgen. We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden. Te denken valt aan tracers voor processen als proliferatie, apoptose en neoangiogenese, die zowel in PAH als in kanker een hoofdrol spelen.

5. Interventiestudies. Interventie op targets die gevonden worden in de Celstudies, Pathobiologiestudies en Reversibiliteitsstudies. [REDACTED]  
[REDACTED] De interventiestudies kunnen worden getest in model I (flow-PAH, als monotherapie -preventief of ter genezing/remming- op het natuurlijk beloop van flow-PAH) en II (PAH-LTx, als add-on therapie náást hemodynamische normalisering).

AD1 en 2) Er wordt reeds 10 jaar onderzoek gedaan naar de pathobiologie van PAH in model Ia (flow-PAH). Uit het bloed of weefsel van deze diermodellen kunnen we (endotheel)cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren. [REDACTED]

AD 3) [REDACTED]

AD4) Op deze modellen kunnen we ook diagnostische interventies toepassen. Diagnostische interventies die reeds geprotocolleerd zijn, zijn electrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Dit is ondersteunende diagnostiek. Ook nieuwe diagnostische technieken, zoals PET-CT kunnen worden toegepast in deze modellen.

AD5) Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen. De targets voor interventie worden gevonden in de studies naar pathobiologie en reversibiliteit die zowel in dit onderzoek als in het onderzoeksconsortium PHAEDRA gevonden worden. [REDACTED]

[REDACTED] De medicatie kan in beide modellen (Ia/b en II (flow-PAH en PAH-LTx) gegeven worden als [REDACTED]

Er wordt gebruik gemaakt van 2, aan elkaar gerelateerde modellen, beide in de rat.

[REDACTED]

[REDACTED]

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.

Samenhang tussen onderzoekslijnen (zie 3.4.2):

In lijn 1 wordt de ziekte op celniveau bestudeerd en kan gezocht worden naar targets voor interventie. Deze targets kunnen met specifieke farmaca gestimuleerd of geremd worden. Dezelfde targets worden daarna bestudeerd op histologisch niveau in lijn 2, Hierin worden tevens klinische, hemodynamische en histologische progressie van PAH en RHF gekarakteriseerd en gestadieerd. Deze karakterisatie is onder andere nodig voor de correlatie van de gegevens uit de imagingstudies, lijn 4. In de Reversibiliteitsstudies, lijn 3, wordt vervolgens het effect van normalisering van de hemodynamiek op de longvaatziekte bestudeerd, of het effect van longtransplantatie op het hart. In de interventiestudies, lijn5, wordt gebruik gemaakt van de targets gevonden in de cel- en pathobiologie en reversibiliteitsstudies. [REDACTED]

Fasering:

De eerste experimenten worden uitgevoerd onder Lijn 1 en 2. Omdat voor de experimenten uit lijn beide longen nodig zijn voor celwerk, en voor de experimenten uit lijn 2 juist de longhistologie van het grootste belang is, kunnen deze lijnen niet in één dierexperiment worden gemanifesteerd. De eerste experimenten uit lijn 1 worden reeds uitgevoerd. De gevonden eitwit/genexpressiepatronen uit lijn 1 kunnen vervolgens specifiek op histologisch niveau worden gevalideerd in de vaatlaesies van longen met PAH (lijn 2).

De gegevens uit lijn 1 en 2 vormen de basis voor experimenten uit lijn 3 en 4. De ziekteprogressie van PAH in de lewis-rat, zoals nodig voor de reversibiliteitsstudies, is reeds goed in kaart gebracht. Ook voor de imagingstudies is met name goede karakterisatie van ziekteprogressie nodig. Lijn 1,2 en 3 leveren targets op voor farmacologische interventie en vormen hiermee de basis voor lijn 5. Bovendien kan het effect van medicatie in de proeven uit lijn 5, evt in vivo gevolgd worden door gebruik te maken van de resultaten uit lijn 4.

Go/No-Go:

Algemeen:

Binnen het PHAEDRA consortium, waarin dit onderzoek wordt uitgevoerd, worden alle lopende onderzoekslijnen eens per kwartaal geëvalueerd. Hierbij zullen ook tijdens lopende projecten (naar aanleiding van eventuele problemen of vertraging in wetenschappelijke progressie) Go/No-go punten geformuleerd worden.

- Lijn 1+2) De onderzoeksmethode en procedures uit lijn 1 en 2 zijn reeds gevalideerd en lopend. In deze lijn worden geen belemmeringen voor de progressie van het onderzoek verwacht.

- Lijn 3) Voor de reversibiliteitsstudies uit lijn 3 wordt momenteel een pilot uitgevoerd om o.a. de haalbaarheid van de procedures te toetsen. [REDACTED]

- Lijn 4) Ook voor de imagingstudies in lijn 4 wordt momenteel een pilot uitgevoerd, om de technische haalbaarheid en het onderscheidend vermogen van PET-CT in flow-PAH te toetsen. Go/No-Go punten betreffen ook hier 1) de overleving van de ratten tijdens of na de PET-CT scanprocedures en 2) of het



primaire ziekteproces goed met de PET-CT tracers is af te beelden. Dit zal per tracer overlegd worden binnen het PHAEDRA consortium en met de afdeling nucleair geneeskundige beeldvormende technieken van het UMCG.

- Lijn 5) De potentie van de te kiezen farmacologische interventie wordt eerst getoetst in celstudies. Hierna zal deze in de diermodellen I en II worden toegepast. Een No-Go punt zou hierbij kunnen zijn: disproportioneel lijden als gevolg van een onverwachte bijwerking van het farmacon. Tevens is het mogelijk (althans tegen de verwachting in) dat er geen geschikt farmacon gevonden wordt in de drugscreen (lijn1). Te denken valt aan farmaca die de verstoorde Tgf- $\beta$ /BMP-balans effectief kunnen herstellen. Bij onvoldoende verwachte potentie van een farmacon zou deze kunnen lijn vervallen. Het vinden en evalueren van een geschikt farmacon voor de behandeling van PAH is een hoofddoel van het PHAEDRA consortium. De overwegingen voor het kiezen en evalueren van een geschikt farmacon zullen binnen het consortium uitgebreid worden besproken.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Flow-PAH
2	PAH-LTx
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]  
A. Deusinglaan 1  
HPC:FA 29  
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
factuur

Datum 08 juni 2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 02 juni 2015 getiteld: Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie.

Het aanvraagnummer dat wij hieraan hebben gegeven AVD105002015129  
Gebruik dit nummer als u contact met ons opneemt.

Door technische omstandigheden is het momenteel niet mogelijk om uw automatische incasso te innen. Bijgaand treft u daarom de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te betalen. Het wijzigen van de betalingswijze, zal de behandeling van uw aanvraag niet vertragen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan een eventuele vergunning worden ingetrokken. Uw eenmalige machtiging komt hierbij te vervallen. Onze excuses voor het ongemak.

**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](#)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]  
A. Deusinglaan 1  
HPC:FA 29  
9713 AV Groningen  
Rijksuniversiteit Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

# Factuur

Factuurdatum 08 juni 2015  
Vervaldatum 08 juli 2015  
Factuurnummer 15700129  
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

## Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD105002015129

## 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.

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer (interne RuG code 8007)
2. Titel van het project: Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie
3. Titel van de NTS: Evaluatie en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie.
4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

-naam **DEC-RUG**  
-telefoonnummer contactpersoon **[REDACTED]**  
**[REDACTED]**  
-mailadres contactpersoon **[REDACTED]**@umcg.nl

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

- ontvangen door DEC **12-05-2015**
- aanvraag compleet **12-05-2015**
- in vergadering besproken **21-05-2015**
- anderszins behandeld **28-05-2015**
- termijnonderbreking(en) van / tot **26-05-2015 - 28-05-2015**
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
- aanpassing aanvraag **28-05-2015**
- advies aan CCD **01-06-2015**

7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**

- 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 **26-05-2015**
- Strekking van de vraag / vragen

**De DEC vraagt:**

- Een duidelijker onderverdeling van de doelen
- Een betere omschrijving van het wetenschappelijk belang
- Een betere omschrijving van de gebruikte specifieke modellen voor de verschillende lijnen
- Een betere samenhang, fasering en beschrijving go/no go criteria van de verschillende lijnen

- Datum antwoord: **28-05-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en):

**De antwoorden hebben geleid tot verbetering van de beschrijving van de aanvraag.**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**

- 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) **Ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren **Ja**

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
- uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
- uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord
- wettelijk vereist

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **Ja**

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **essentieel / substantieel** belang. **Het belang van de doelstelling (Onderzoek naar pathofysiologie en behandeling van PAH) wordt door de DEC erkend.**

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **Ja. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en voorzieningen om de doelstelling binnen de gevraagde termijn te realiseren.**

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **n.v.t.**

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

**Bijlage 1: ja**

**Bijlage 2: ja**

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen.**

**Nee. Omdat de aanvragers hemodynamische parameters bestuderen, is er geen vervanging mogelijk voor deze experimenten.**

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

**Per aangevraagde dierproef beschrijven de aanvragers het aantal aan te vragen dieren. Dat wordt realistisch ingeschat. In voorkomende gevallen worden pilotstudies uitgevoerd om een adequate powerberekening te kunnen uitvoeren. In andere gevallen wordt uitgegaan van bestaande gegevens om een powerberekening te kunnen doen. Aanvragers gebruiken in vitro testen op endotheel cellen van ratten met PAH. Hierop worden therapieën getest, zodat niet elke potentiële therapie in vivo getest hoeft te worden. Er worden go/no go momenten ingebouwd om onnodig proefdier gebruik te voorkomen. De groep waarin aanvrager werkt heeft jarenlange expertise op dit gebied om duplicatie te voorkomen.**

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 aanvragers doen al het mogelijke om verfijning te bewerkstelligen. Dieren worden regelmatig gemonitord via een door hunzelf uitontwikkeld en goed werkend systeem.**

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



## **D. Ethische afweging**

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren, de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project voordelen opleveren voor mens, dier of milieu

**De DEC is van oordeel dat de aangegeven doelen en de daarbij behorende onderzoeksopzet het gebruik van proefdieren rechtvaardigen. Daarbij is rekening gehouden met de potentiële uiteindelijke klinische waarde van het project en met de wijze waarop de onderzoekers de 3V's hanteren. Cardiovasculaire ziekten zijn een veel voorkomend probleem. PAH in het bijzonder is op dit moment niet te genezen.**

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

**X De DEC adviseert de vergunning te verlenen**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheidsminderheidsstandpunt

**Dit besluit is unaniem door de DEC genomen**



## 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          | Flow-PAH.      |

*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.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. Dit zorgt voor een chronisch verhoogde pulmonale vaatweerstand, wat leidt tot rechter hart falen (RHF) en uiteindelijk de dood. PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een aangeboren cardiale systemisch-pulmonale shunt (PAH-CHD). Bij deze kinderen wordt aangenomen dat de toegenomen pulmonale flow en druk -een gevolg van de shunt- een essentiële trigger is voor het ontwikkelen van PAH. Eerder in ons lab is aangetoond dat toegenomen long-arteriële flow en druk ook bij ratten leidt tot de vaatafwijkingen en het geassocieerde rechter ventrikel falen, die de humane vorm van PAH

karakteriseren.

Primaire, reeds gevalideerde uitkomstmaten in dit model:

De ziekteprogressie van PAH kan in vivo gemeten worden door middel van echocardiografie, telemetrie en/of hartcatheterisatie. Ziekte-ernst kan ex vivo worden gemeten op basis van de pulmonale vasculaire longmorfologie en pathologische kenmerken van rechter hartfalen. Deze uitkomstmaten zijn hieronder verder gespecificeerd.

1. Klinische tekenen van rechter kamer dysfunctie, zich uitend in verminderde inspanningstolerantie en veranderingen in activiteit, lichaamsgewicht, perifere circulatie, cyanose, dys- tachypnoe, oedeem en effusie.

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

2. Parameters voor pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie, gemeten m.b.v. echocardiografie en rechter hartcatheterisatie.

Echocardiografische parameters waarmee we de pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie kunnen bepalen zijn o.a.: Pulmonale acceleratietijd, pulmonale vasculaire weerstand, RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies). Voor deze parameters zijn eerder waarden bepaald in rat (Dickinson, Borgdorff 2011-2015, Urashima 2008 e.v.a.).

Rechter hartcatheterisatie wordt gebruikt om de bloeddruk te bepalen in het rechter atrium, rechter ventrikel, de pulmonaal arterie (arteriële pulmonale druk), en de wiggedruk (veneuze pulmonale druk). Daarnaast kunnen druk-volume relaties worden bepaald. Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met (verdenking op) PAH. Tevens kan telemetrie gebruikt worden om rechtsdruk continu te meten, wat tevens een maat is voor PAH.

3. Pulmonale vasculaire morfologie (ex vivo). De histomorfologie van de longarteriën is de gouden standaard in de evaluatie van PAH. Specifiek wordt gekeken naar het soort vasculaire laesie (media hypertrofie, neo-intimalaesie), wand-lumen ratio en occlusiescore. De histomorfologie in verschillende fasen en soorten van PAH is reeds in ons lab gekarakteriseerd (van Albada, van Loon, Dickinson 2005-2014).

4. Maten voor RV-falen (ex vivo). Dit zijn parameters voor rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht (fulton ratio), en/of b) lichaamsgewicht; en parameters voor rechter ventrikel falen: lever-oedeem, gemeten als wet-dry ratio van de onderste leverlobe.

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.

REEDS GESTANDAARDISEERDE BEHANDELING VAN DE DIEREN EN TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Flow-PAH in de rat.

Aard en frequentie van de behandeling: 1 malige injectie met monocrotaline (MCT), gevolgd door een 1 malige chirurgische aanleg van een aorto-cavale shunt.

Duur: De dieren worden op verschillende tijdstippen in de ziekteprogressie geofferd. Zonder behandeling is dit tussen 1 dag na shunt (T8) en 3 weken na shunt (T28), of wanneer de dieren tekenen van rechter ventrikel falen ontwikkelen (dit vindt echter meestal plaats tussen T28 en T35).

Dit model resulteert in een ziekte-fenotype dat sterk overeenkomt met de menselijke vorm van PAH-CHD. Voor dit model van hanteren wij ratten van 200-250 gram.

Controlemodellen op het flow-PAH model met ziekteontwikkeling, zijn 1) het MCT-only en 2) flow-only model, waarbij ofwel alleen 1) een MCT-injectie wordt gegeven, ofwel alleen 2) een aortocavale shunt wordt aangelegd. In het ziektevrije controlemodel krijgen de dieren een injectie met fysiologisch zout en een sham-operatie.

Afhankelijk van de vraagstelling kan het dier in verschillende fasen van ziekteprogressie geofferd worden. De ziekte-ernst (hemodynamisch, histomorfologisch) is reeds voor een aantal belangrijke tijdstippen in kaart gebracht (1 dag na shunt, 7 dagen na shunt, 21 dagen na shunt). Tijdens ziekteprogressie kunnen eventueel bloedmonsters genomen worden voor biomarker analyse. Dit zal gebeuren via orbita of staart.

Dit model kan ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. Hiervoor zullen doorgaans twee groepen gebruikt worden (met en zonder behandeling). Afhankelijk van de medicatie kunnen verschillende toedieningsvormen worden gebruikt: oraal via voer of drinkwater; via osmotische mini-pomp, IP, IV, subcutane of intramusculaire injecties. Indien mogelijk zal de toediening gekozen worden waarbij het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk is, maar waarbij de gekozen dosering wel met redelijke zekerheid gewaarborgd is.

#### NIEUWE TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Het model voor flow-PAH, of haar variaties en controles kan worden gebruikt voor een aantal nieuwe toepassingen, relevant voor het voorgestelde project.

1) Er is in ons lab een methode ontwikkeld om endotheelcellen te isoleren uit de rattenlongen op verschillende tijdstippen van de ziekte. PAH wordt hiertoe geïnduceerd en gekarakteriseerd zoals hierboven beschreven, waarna de rat wordt geofferd en de longen worden uitgenomen. De geïsoleerde endotheelcellen kunnen vervolgens worden gebruikt voor genotypering, het onderzoeken van signaleringspathways en het testen van farmacologische compounds.

2) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van bestaande PET tracers tbv de in vivo imaging van de ziekte.

3) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van nieuwe farmacologische behandelingsopties voor PAH. Medicatie kan op elk gewenst moment (preventief of bij gemanifesteerde ziekte) worden toegediend, via de hierboven beschreven toedieningswegen.

---

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

Er is reeds veel data beschikbaar over het induceren van PAH en geassocieerd RVF in het bovengenoemde model. Op basis van onze primaire uitkomstmaten kunnen power-analyses berekend worden die het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken. Bij een nieuwe therapeutische of diagnostische interventie zullen we de minimale groepsgroottes berekenen op basis van vergelijkbare onderzoeken in vergelijkbare modellen. Als deze onderzoeken niet voor handen zijn of teveel afwijken van ons beoogde model, zullen we een pilot-experiment uitvoeren om onze power-analyse te berekenen.

Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses. De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen daarnaast in retrospect worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.

De verkregen cellen uit de endotheelisolatie kunnen worden doorgeweekt en gebruikt worden om een drugscreen (in vitro) te verrichten. Het meest geschikte farmacon kunnen we vervolgens testen in vivo.

Door niet-invasieve methoden als echografie en PET onder anesthesie te gebruiken, kunnen wij de ziekteprogressie over de tijd vervolgen. Derhalve hoeven deze dieren niet te worden geofferd op verschillende tijdpunten. Dit reduceert het aantal dieren.

Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor immunohistochemische analyses. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De experimentele groepen zullen worden vergeleken met behulp van ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt een alpha van 0.05 aangehouden en streven we een power na van >80%.

---

## **B. De dieren**

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

Diersoorten: Ratten. Inbred (tbv model II PAH-LTx, bijlage 2) en outbred.

Herkomst: code B. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen. (Harlan, Horst, NL).

Levensstadium: De ratten zijn 7 à 8 weken bij start experiment, 12-14 weken bij opofferen. Het model is gevalideerd voor dit levensstadium.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Omdat de hemodynamische parameters, de rechter kamer functie en gewichten en de long en hart histologie de belangrijkste uitkomstparameters zijn, is vervanging door een cel- of computermodel niet mogelijk.

Vermindering/Verfijning: In ons lab bestaat ruime ervaring met het MCT-Flow-model in de rat. Groepsgroottes zijn gebaseerd op de verschillen in primaire uitkomstmaten tussen de experimentele groepen. Hierbij werden groepsgroottes van 4-8 ratten per groep aangehouden. Dit is ook gebruikelijk in modellen voor PAH in de wetenschappelijke literatuur in andere laboratoria. Er worden pilotstudies uitgevoerd ter beoordeling van de haalbaarheid van de experimenten en voor het berekenen van een poweranalyse. De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen. Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

In de celstudies uit lijn 1 (projectvoorstel) worden endotheelcellen van ratten met PAH doorgeweekt om farmacologische targets te testen. PAH moet wel worden opgewekt in een diermodel om de cellen te verkrijgen (geen vervanging), maar het doorkweken van de cellen geeft de mogelijkheid de therapiën eerst in vitro te testen, waarna alleen de meest potente farmaca daadwerkelijk in vivo zullen worden getoetst. Dit leidt tot een vermindering van het aantal

benodigde dieren.

Tijdens hun verblijf op het CDP worden de dieren 3 keer per week of vaker op indicatie gemonitord volgens het ABCD systeem, dat gehanteerd wordt door alle onderzoekers van de afdeling kinder cardiologie. Hierbij wordt het dier in een standaard volgorde geëvalueerd op symptomen van hartfalen.

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 dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met verrijking. De dieren worden gehuisvest volgens de standaard huisvesting in het CDP Groningen.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het CDP Groningen.
- Er wordt narcose en kapbeademing toegepast rondom de echocardiografie en evt PET-scan waaruit de dieren weer ontwaken. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen, (PET scan) en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen

## 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.

- 

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen longvaatweerstand.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd.

### 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.

Sommige dieren zullen eind-stadium PAH moeten bereiken om onze onderzoeksvragen te beantwoorden.



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

10-15%

#### K. Classificatie van ongerief

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

matig.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie van het hart en de longen is een essentiële uitkomstmaat voor PAH en geassocieerd RHF. Tevens wordt dit materiaal (en bloed) gebruikt voor verder laboratoriumonderzoek om geassocieerde mechanismen te onderzoeken.

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="PAH-LTx"/> |

*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.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. PAH in congenitale hartaandoeningen (CHD) kent echter ook een unieke, reversibele fase. PAH in CHD wordt veroorzaakt door een toegenomen pulmonale flow en druk: een gevolg van een systemisch-naar-pulmonale shunt die bestaat bij veel CHD. Tijdige correctie van de shunt (normalisering van de pulmonale hemodynamiek in een reversibel PAH stadium) kan ervoor zorgen dat de vaatafwijkingen bij PAH volledig genezen. Wordt de hartafwijking te laat gecorrigeerd (in een irreversibel PAH stadium), dan is genezing niet meer mogelijk en leidt correctie van de hartafwijking zelfs sneller tot de dood dan wanneer niet chirurgisch

wordt ingegrepen. 10% van alle kinderen met PAH-CHD wordt momenteel beoordeeld als irreversibel en worden derhalve niet geopereerd. 2-8% van de kinderen die wel worden geopereerd, ontwikkelen alsnog irreversibele PAH ondanks correctie van hun hartdefect. Het doel van dit deelproject is de mechanismen die bijdragen aan het ontstaan van irreversibiliteit (progressie) of reversibiliteit (herstel) beter te begrijpen. Dit kan leiden tot nieuwe methoden om een reversibel of irreversibel PAH stadium van elkaar te onderscheiden en tot nieuwe targets voor farmacologische interventie.

Samenvattend: Deze deelstudie onderzoekt het effect van hemodynamische normalisering op het fenotype van PAH in verschillende fasen van de ziekte. We brengen hiertoe een long met PAH (zeer vroeg, vroeg, gevorderd en eind-stadium) in een hemodynamisch normale situatie, door middel van long transplantatie. We hebben voor een longtransplantatiemodel (LTx) gekozen als methode van hemodynamische normalisering, omdat er in ons centrum veel ervaring is met het transplanteren van longen in de rat. Een soortgelijke methode van hemodynamische normalisering in Pulmonale Hypertensie is reeds succesvol uitgevoerd in (O'Blenes, J Thorac Cardiovasc Surg. 2001). Dit betrof echter een model met een significant verschillend ziektefenotype). De long histologie is in deze studie de belangrijkste uitkomstmaat. Het LTx model geeft hierin de unieke mogelijkheid zowel de baseline histologie in verschillende ziektefasen te karakteriseren in de niet te transplanteren (rechter) long, en dit af te zetten tegen de getransplanteerde (linker) long, na een periode van hemodynamische normalisering. Deze getransplanteerde (zieke) linker long kan vervolgens weer worden afgezet tegen de (niet zieke) rechterlong van de ontvanger. De specifieke procedure wordt hieronder verder uitgelegd.

Specifieke uitkomstmaten voor reversibiliteit zijn regressie van de vaatafwijkingen na LTx, kwantitatief uitgedrukt in verlaagde vasculaire occlusiescores, kwalitatief uitgedrukt in normaliseren van de vasculaire morfologie. Irreversibiliteit wordt primair gedefinieerd als status quo of progressie van de vaatafwijkingen na LTx.

---

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.

Deze deel studie onderzoekt de reversibiliteit van vasculaire remodelering en geassocieerde mechanismen in de progressie van flow-PAH. We willen dit onderzoeken middels een longtransplantatie-(LTx-)model.

DONORRAT (induceren PAH):

T=0: Injectie monocrotaline (60mg/kg), eenmalig.

T=7: Aanleg aorto-cavale shunt, eenmalig. De shunt wordt gemaakt door met een 18G holle naald via de abdominale aorta een gat in de vena cava te prikken. Het gat in de aorta wordt vervolgens gedicht met weefselijm. Deze operatie duurt ca. 20 min en wordt geheel uitgevoerd onder inhalatieanesthesie. Het uitvalspercentage van de operatie is hooguit 10%.

T=7 tot maximaal T=28: Ziekteontwikkeling PAH. Per studiegroep wordt de linkerlong op verschillende momenten van ziekteprogressie (T=8, 14, 21 of 28) getransplanteerd in een gezonde ontvanger. De donorrat wordt hierna geofferd.

ONTVANGENDE RAT (LTx rat):

T=0: explantatie linkerlong, implantatie donorlong. De long wordt getransplanteerd volgens de standaard longtransplantatieprocedure die reeds meer dan 2000 keer is uitgevoerd in dit centrum. De procedure duurt in zijn geheel zo'n 4u en wordt geheel uitgevoerd onder inhalatieanaesthesie. Het uitvalspercentage van de operatie is hooguit 15%.

T=7 tot maximaal T=28: periode van hemodynamische normalisering op de donor long. Per studiegroep wordt de rat op verschillende momenten geofferd (1 tot maximaal 4 weken na LTx).

Dit model kan ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. Hiervoor zullen doorgaans twee groepen gebruikt worden (met en zonder behandeling). Afhankelijk van de medicatie kunnen verschillende toedieningsvormen worden gebruikt: oraal via voer of drinkwater; via osmotische mini-pomp, IP, IV, subcutane of intramusculaire injecties. Indien mogelijk zal de toediening gekozen worden waarbij het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk is, maar waarbij de gekozen dosering wel met redelijke zekerheid gewaarborgd is.

---

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

Er is reeds veel data beschikbaar over de primaire uitkomstmaten in flow-PAH, welke ook gelden in het huidige PAH-LTx model. Hierop kunnen power-analyses berekend worden die het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken. Daarnaast wordt momenteel een pilot-experiment voorbereid om (onder andere) onze power-analyse te berekenen.

Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor immunohistochemische analyses. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De experimentele groepen zullen worden vergeleken met behulp van ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt een alpha van 0.05 aangehouden en streven we een power na van >80%.

---

## **B. De dieren**

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

Diersoorten: Ratten. Inbred (ivm transplantatie).

Herkomst: code B. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen. (Harlan, Horst, NL).

Aantal: 450.

[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED] We verwachten 3 [REDACTED] experimenten uit te voeren binnen de periode van 5 jaar. We houden momenteel rekening met een kans op uitval van maximaal 15%. Dit gaat in totaal dan om een geschat aantal van 525 dieren.

Levensstadium: De donorratten zijn 7 à 8 weken bij start experiment, 12-14 weken bij LTx. De ontvangers zijn tevens 10-12 weken bij LTx en 14-16 weken bij offeren.

---

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

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

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

Vervanging: Omdat de hemodynamische parameters, de rechter kamer functie en gewichten en de long en hart histologie de belangrijkste uitkomstparameters zijn, is vervanging door een cel- of computermodel niet mogelijk.

Vermindering/Verfijning:

[REDACTED]. Op basis hiervan wordt de haalbaarheid beoordeeld en zullen de groepsgroottes worden berekend middels poweranalyse. De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen. Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

Tijdens hun verblijf op het CDP worden de dieren 3 keer per week of vaker op indicatie gemonitord volgens het ABCD systeem, dat gehanteerd wordt door alle onderzoekers van de afdeling kindercardiologie UMCG. Hierbij wordt het dier in een standaard volgorde geëvalueerd op symptomen van hartfalen.

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 dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met verrijking. De dieren worden gehuisvest volgens de standaard huisvesting in het CDP Groningen.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het CDP Groningen.
- Er wordt narcose en kapbeademing toegepast rondom de echocardiografie en evt PET-scan waaruit de dieren weer ontwaken. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen.
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen

## 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.

- Er zijn eerdere studies die PAH ratten longen transplanteren in een gezonde ontvanger (O'Blenes, 2001). Hierbij werd alleen gekeken naar effect van transplantatie in de vroege fase van de ziekte, in een single hit (monocrotaline-only) model voor PH, zonder de karakteristieke neo-intima leasies. In deze studie toetsen we reversibiliteit in een model met neointima leasies, een zogenaamd "double hit model" (MCT+Flow).

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie). Peroperatieve pijn.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen longvaatweerstand

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

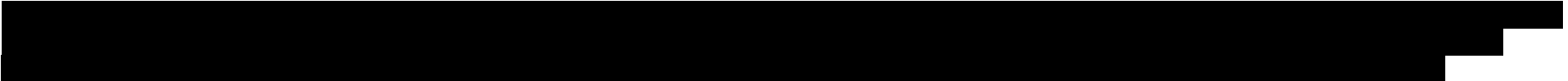
De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd..

### 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.

- 
- De ontvangende dieren zijn gezond en ontvangen één long met variërende PAH stadia. Er zijn ratmodellen bekend waarbij ratten met slechts één long kunnen gedijen, zonder symptomen van dyspnoe. We verwachten niet dat de ontvangende dieren het humane eindpunt zullen halen. De ontvangende dieren zullen peroperatief gemonitord worden op complicaties van de LTx.
- De humane eindpunten zijn symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid en lethargie), welke gemonitord worden volgens het ABCD protocol. Eventuele post-operatieve complicaties van de longtransplantatie zullen zich ook uiten in deze 3 symptomen.

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

10-15%

### K. Classificatie van ongerief

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

matig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie van het hart en de longen is een essentiële uitkomstmaat voor PAH en geassocieerd RHF. Tevens wordt dit materiaal (en bloed) gebruikt voor verder laboratoriumonderzoek om geassocieerde mechanismen te onderzoeken.

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





## 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  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 - -
- 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.  Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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	

**Van:** [REDACTED]@umcg.nl>  
**Verzonden:** maandag 8 juni 2015 11:45  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: vraag betreffend projectaanvraag RuG code 8007

Beste [REDACTED]

De specifieke vraag of beide geslachten voor het onderzoek bruikbaar zijn is niet ter sprake gekomen tijdens de vergadering.

Vr. gr.

[REDACTED]  
Secretaris DEC

---

**From:** [REDACTED]  
**Sent:** maandag 8 juni 2015 11:19  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** vraag betreffend projectaanvraag RuG code 8007

Geachte meneer [REDACTED]

Betreffende projectaanvraag: 'pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie' met AVD nummer 105002015129, bij u bekend onder interne RuGcode8007, is door uw DEC advies uitgebracht aan de CCD. Wij willen een vraag aan de onderzoeker stellen over de dieren die gebruikt worden voor dit onderzoek. In de beschrijving dieproeven wordt alleen het gebruik van ratten beschreven, de CCD wil u vragen of in de vergadering van de DEC ter sprake is gekomen of het mogelijk zou zijn beide geslachten voor dit onderzoek te gebruiken.

Ik hoor graag van u, mocht u dit niet besproken zijn dan zullen wij de onderzoeker vragen deze beschrijving nader toe te lichten en indien nodig meer specifiek het gebruik van 1 geslacht toe te onderbouwen,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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

De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO.nl) stimuleert Duurzaam, Agrarisch, Innovatief en Internationaal ondernemen. RVO.nl is per 2014 ontstaan uit de fusie van Agentschap NL en Dienst Regelingen.

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.

---

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 8 juni 2015 14:05  
**Aan:** [REDACTED]@rug.nl'; [REDACTED]@umcg.nl'  
**Onderwerp:** aanvullende vragen AVD105002015129  
**Bijlagen:** aanhouden.beoordelen129.pdf

Geachte [REDACTED]

Wij hebben nog een paar vragen over uw projectaanvraag.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

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

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

[REDACTED]

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** woensdag 8 juli 2015 10:00  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Dierproef ontvangsten 7-7-2015  
**Categorieën:** [REDACTED]

EREF IBAN/NL45INGB0651575079BIC/INGBNL2ANAME/UMCG TAV FIN ADM HPC LB25/REMI/15700129EREF100-1248-327-113586 (741 euro)

Met vriendelijke Groet,

[REDACTED]  
Medewerker Financiële administratie

.....  
**Team Apparaatsadministratie**  
**Financien en Control**  
**Rijksdienst voor Ondernemend Nederland**  
.....

T [REDACTED]  
[REDACTED]@rvo.nl  
<http://www.rvo.nl>



## 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          | Flow-PAH.      |

*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.

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot neo-intimavorming en irreversibele obstructie van de long arteriolen. Dit zorgt voor een chronisch verhoogde pulmonale vaatweerstand, wat leidt tot rechter hart falen (RHF) en uiteindelijk de dood. PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een aangeboren cardiale systemisch-pulmonale shunt (PAH-CHD). Bij deze kinderen wordt aangenomen dat de toegenomen pulmonale flow en druk -een gevolg van de shunt- een essentiële trigger is voor het ontwikkelen van PAH. Eerder in ons lab is aangetoond dat toegenomen long-arteriële flow en druk ook bij ratten leidt tot de vaatafwijkingen en het geassocieerde rechter ventrikel falen, die de humane vorm van PAH



karakteriseren.

Primaire, reeds gevalideerde uitkomstmaten in dit model:

De ziekteprogressie van PAH kan in vivo gemeten worden door middel van echocardiografie, telemetrie en/of hartcatheterisatie. Ziekte-ernst kan ex vivo worden gemeten op basis van de pulmonale vasculaire longmorfologie en pathologische kenmerken van rechter hartfalen. Deze uitkomstmaten zijn hieronder verder gespecificeerd.

1. Klinische tekenen van rechter kamer dysfunctie, zich uitend in verminderde inspanningstolerantie en veranderingen in activiteit, lichaamsgewicht, perifere circulatie, cyanose, dys- tachypnoe, oedeem en effusie.

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met RV falen.

2. Parameters voor pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie, gemeten m.b.v. echocardiografie en rechter hartcatheterisatie.

Echocardiografische parameters waarmee we de pulmonale hemodynamiek en rechter ventrikel functie kunnen bepalen zijn o.a.: Pulmonale acceleratietijd, pulmonale vasculaire weerstand, RV/LV ratio, RV einddiastolische dimensie, TAPSE (tricuspidalis annular plane systolic excursion, een maat voor de longitudinale functie van de rechter ventrikel), mate van tricuspidalis regurgitatie en daarnaast ook de linker kamer functie (Shortening fraction en LV einddiastolische en systolische dimensies). Voor deze parameters zijn eerder waarden bepaald in rat (Dickinson, Borgdorff 2011-2015, Urashima 2008 e.v.a.).

Rechter hartcatheterisatie wordt gebruikt om de bloeddruk te bepalen in het rechter atrium, rechter ventrikel, de pulmonaal arterie (arteriële pulmonale druk), en de wiggedruk (veneuze pulmonale druk). Daarnaast kunnen druk-volume relaties worden bepaald. Parameters uit de druk-volume relatie waarmee we de RV functie kunnen beschrijven zijn de eindsystolische elastantie (Ees) en einddiastolische elastantie (Eed), de Preload Recrutable Stroke Work en verhouding tussen arteriële en ventriculaire elastantie (Ea/Ees).

Dit zijn parameters die ook gebruikt worden in de klinische evaluatie van patiënten met (verdenking op) PAH. Tevens kan telemetrie gebruikt worden om rechtsdruk continu te meten, wat tevens een maat is voor PAH.

3. Pulmonale vasculaire morfologie (ex vivo). De histomorfologie van de longarteriën is de gouden standaard in de evaluatie van PAH. Specifiek wordt gekeken naar het soort vasculaire laesie (media hypertrofie, neo-intimalaesie), wand-lumen ratio en oclusiescore. De histomorfologie in verschillende fasen en soorten van PAH is reeds in ons lab gekarakteriseerd (van Albada, van Loon, Dickinson 2005-2014).

4. Maten voor RV-falen (ex vivo). Dit zijn parameters voor rechter ventrikel hypertrofie, te meten als RV gewicht genormaliseerd voor a) linker ventrikel gewicht (fulton ratio), en/of b) lichaamsgewicht; en parameters voor rechter ventrikel falen: lever-oedeem, gemeten als wet-dry ratio van de onderste leverlobe.

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.

REEDS GESTANDAARDISEERDE BEHANDELING VAN DE DIEREN EN TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Flow-PAH in de rat.

Aard en frequentie van de behandeling: 1 malige injectie met monocrotaline (MCT), gevolgd door een 1 malige chirurgische aanleg van een aorto-cavale shunt.

Dit model resulteert in een ziekte-fenotype dat sterk overeenkomt met de menselijke vorm van PAH-CHD. Voor dit model van hanteren wij ratten van 200-250 gram.

Controlemodellen op het flow-PAH model met ziekteontwikkeling, zijn 1) het MCT-only en 2) flow-only model, waarbij ofwel alleen 1) een MCT-injectie wordt gegeven, ofwel alleen 2) een aortocavale shunt wordt aangelegd. In het ziektevrije controlemodel krijgen de dieren een injectie met fysiologisch zout en een sham-operatie.

Afhankelijk van de vraagstelling kan het dier in verschillende fasen van ziekteprogressie geofferd worden. De ziekte-ernst (hemodynamisch, histomorfologisch) is reeds voor een aantal belangrijke tijdstippen in kaart gebracht (1 dag na shunt, 7 dagen na shunt, 21 dagen na shunt). Tijdens ziekteprogressie kunnen eventueel bloedmonsters genomen worden voor biomarker analyse.

Dit model kan ook worden gebruikt om de effecten te onderzoeken van medicamenten. Hiervoor zullen doorgaans twee groepen gebruikt worden (met en zonder behandeling). Afhankelijk van de medicatie kunnen verschillende toedieningsvormen worden gebruikt: oraal via voer of drinkwater; via osmotische mini-pomp, IP, IV, subcutane of intramusculaire injecties. Indien mogelijk zal de toediening gekozen worden waarbij het ongerief voor de dieren zo laag mogelijk is, maar waarbij de gekozen dosering wel met redelijke zekerheid gewaarborgd is.

#### NIEUWE TOEPASSINGEN VAN DIT MODEL:

Het model voor flow-PAH, of haar variaties en controles kan worden gebruikt voor een aantal nieuwe toepassingen, relevant voor het voorgestelde project.

1) Er is in ons lab een methode ontwikkeld om endotheelcellen te isoleren uit de rattenlongen op verschillende tijdstippen van de ziekte. PAH wordt hiertoe geïnduceerd en gekarakteriseerd zoals hierboven beschreven, waarna de rat wordt geofferd en de longen worden uitgenomen. De geïsoleerde endotheelcellen kunnen vervolgens worden gebruikt voor genotypering, het onderzoeken van signaleringspathways en het testen van farmacologische compounds.

2) Karakteriseren van de rol van geslacht op de progressie van PAH. We kunnen het ratmodel voor flow-PAH ook toepassen op vrouwelijke ratten om zo het effect van geslacht(hormonen) op de ziekteprogressie van PAH te onderzoeken. PAH wordt op eenzelfde manier geïnduceerd en vergeleken met de ziekteprogressie in mannelijke ratten volgens de hierboven beschreven eindpunten.

3) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van bestaande PET tracers tbv de in vivo imaging van de ziekte.

4) Dit model kan worden gebruikt voor het testen van nieuwe farmacologische behandelingsopties voor PAH. Medicatie kan op elk gewenst moment (preventief of bij gemanifesteerde ziekte) worden toegediend, via de hierboven beschreven toedieningswegen.

---

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

Er is reeds veel data beschikbaar over het induceren van PAH en geassocieerd RVF in het bovengenoemde model. Op basis van onze primaire uitkomstmaten kunnen power-analyses berekend worden die het aantal benodigde dieren tot een minimum beperken. Bij een nieuwe therapeutische of diagnostische interventie zullen we de minimale groepsgroottes berekenen op basis van vergelijkbare onderzoeken in vergelijkbare modellen. Als deze onderzoeken niet voor handen zijn of teveel afwijken van ons beoogde model, zullen we een pilot-experiment uitvoeren om onze power-analyse te berekenen.

Tevens zullen deze pilot studies ons voorzien van extra gegevens die kunnen worden gebruikt bij de power analyses. De verworven resultaten uit deze pilot-studies kunnen daarnaast in retrospect worden gebruikt om te vergelijken met de resultaten van de uiteindelijke studies.

De verkregen cellen uit de endotheelisolatie kunnen worden doorgekweekt en gebruikt worden om een drugscreen (in vitro) te verrichten. Het meest geschikte farmacon kunnen we vervolgens testen in vivo.

Door niet-invasieve methoden als echografie en PET onder anesthesie te gebruiken, kunnen wij de ziekteprogressie over de tijd vervolgen. Derhalve hoeven deze dieren niet te worden geofferd op verschillende tijdpunten. Dit reduceert het aantal dieren.

Zoveel mogelijk weefsel zal na offeren worden gepreserveerd voor immunohistochemische analyses. Dit materiaal kan ook in de toekomst gebruikt worden voor nieuw ontwikkelde onderzoeksvragen, waar dan te zijner tijd geen nieuwe proefdieren voor nodig zijn.

Gegevens voortkomend uit controlegroepen zullen indien mogelijk worden gedeeld.

De volgende statistiek zal worden toegepast:

De experimentele groepen zullen worden vergeleken met behulp van ANOVA en post-hoc tests met Bonferroni correctie. Over het algemeen wordt een alpha van 0.05 aangehouden en streven we een power na van >80%.

---

## B. De dieren

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

Diersoorten: Ratten. Inbred (tbv model II PAH-LTx, bijlage 2) en outbred.

Herkomst: code B. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen. (Harlan, Horst, NL).

Levensstadium: De ratten zijn 7 à 8 weken bij start experiment, 12-14 weken bij opofferen. Het model is gevalideerd voor dit levensstadium.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging: Omdat de hemodynamische parameters, de rechter kamer functie en gewichten en de long en hart histologie de belangrijkste uitkomstparameters zijn, is vervanging door een cel- of computermodel niet mogelijk.

Vermindering/Verfijning: In ons lab bestaat ruime ervaring met het MCT-Flow-model in de rat. Groepsgroottes zijn gebaseerd op de verschillen in primaire uitkomstmaten tussen de experimentele groepen. Hierbij werden groepsgroottes van 4-8 ratten per groep aangehouden. Dit is ook gebruikelijk in modellen voor PAH in de wetenschappelijke literatuur in andere laboratoria. Er worden pilotstudies uitgevoerd ter beoordeling van de haalbaarheid van de experimenten en voor het berekenen van een poweranalyse. De individuele experimenten in huidige onderzoekslijn worden trapsgewijs uitgevoerd, waarbij een aantal Go/No-Go punten worden gehanteerd. Zo voorkomen we overbodige experimenten en kan de experimentele procedure verfijnd worden tijdens het onderzoek. Deze Go/No-Go punten worden beschreven in de IvD-protocollen. Van alle dieren worden alle relevante organen en zoveel mogelijk bloed opgeslagen voor post-hoc analyses.

In de celstudies uit lijn 1 (projectvoorstel) worden endotheelcellen van ratten met PAH doorgekweekt om farmacologische targets te testen. PAH moet wel

worden opgewekt in een diemodel om de cellen te verkrijgen (geen vervanging), maar het doorkweken van de cellen geeft de mogelijkheid de therapiën eerst in vitro te testen, waarna alleen de meest potente farmaca daadwerkelijk in vivo zullen worden getoetst. Dit leidt tot een vermindering van het aantal benodigde dieren.

Tijdens hun verblijf op het CDP worden de dieren 3 keer per week of vaker op indicatie gemonitord volgens het ABCD systeem, dat gehanteerd wordt door alle onderzoekers van de afdeling kindercardiologie. Hierbij wordt het dier in een standaard volgorde geëvalueerd op symptomen van hartfalen.

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 dieren krijgen 1 week gewenning na aankomst in het dierenlab.
- De dieren worden in groepen van max 5 gehuisvest, in kooien met verrijking. De dieren worden gehuisvest volgens de standaard huisvesting in het CDP Groningen.
- Er wordt pijnstilling toegepast zowel peroperatief als postoperatief volgens de geldende richtlijnen op het CDP Groningen.
- Er wordt narcose en kapbeademing toegepast rondom de echocardiografie en evt PET-scan waaruit de dieren weer ontwaken. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen
- Er wordt narcose gebruikt bij de hemodynamische metingen, (PET scan) en het offeren nadien. Hieruit ontwaken de dieren niet. Hiervoor worden de geldende protocollen gebruikt op het CDP in Groningen

## 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.

- 

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie)

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Een verminderde rechter kamer functie door een toegenomen longvaatweerstand.

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

De dieren worden 3x per week (en op indicatie vaker), gemonitord op tekenen van rechter hart falen. Bij ernstig RVF (lethargie, zichtbare dyspnoe) worden dieren geofferd.

### 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.

Sommige dieren zullen eind-stadium PAH moeten bereiken om onze onderzoeksvragen te beantwoorden. [REDACTED]

[REDACTED]. Het merendeel van de experimenten (>90%) zullen we uitvoeren met dieren die op of vóór dag 28 geofferd zullen worden. Meer dan de helft van deze dieren zal bovendien al voor dag 14 geofferd worden (vroeg-stadium PAH). De humane eindpunten zijn symptomen van rechter hart falen (gewichtsverlies, kortademigheid, lethargie), welke gemonitord worden volgens het ABCD protocol.

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

10-15%

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

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

matig.

### **Einde experiment**

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

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

Histologie van het hart en de longen is een essentiële uitkomstmaat voor PAH en geassocieerd RHF. Tevens wordt dit materiaal (en bloed) gebruikt voor verder laboratoriumonderzoek om geassocieerde mechanismen te onderzoeken.

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. University Medical Center Groningen - [REDACTED].
- 1.3 Vul de titel van het project in. Pathobiologie, Reversibiliteit, Imaging en Behandeling van Pulmonale arteriële hypertensie.

### 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.

#### AANLEIDING

Pulmonale arteriële hypertensie (PAH) is een ernstige, progressieve en irreversibele longvaataandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. PAH kenmerkt zich door een uniek patroon van longvaatremodellering, welke uiteindelijk leidt tot progressieve obstructie van de long arteriolen. Het histologisch beeld van de vaatlaesies in PAH is inmiddels goed in kaart gebracht, maar het onderliggende mechanisme wordt nog onvoldoende begrepen.

PAH komt voor bij een aantal onderliggende aandoeningen, waaronder bij kinderen met een congenitale hartafwijking (PAH-CHD). Het is bekend dat correctie van deze hartafwijking in een vroeg (reversibel) stadium van de ziekte kan leiden tot volledig klinisch herstel en regressie van de vaatlaesies. Te late correctie, in een irreversibel stadium van de ziekte, kan echter leiden tot versnelde ziekteprogressie en de dood. Het is voor de keuze en timing van interventie in PAH-CHD daarom essentieel de progressie en het stadium van de ziekte goed in kaart te brengen. Huidige diagnostische technieken blijken echter nog onvoldoende betrouwbaar om het onderscheid te maken tussen reversibele en irreversibele PAH, en zijn bovendien invasief en belastend voor het (jonge) kind.

Wanneer PAH-CHD irreversibel is, is longtransplantatie (LTx) momenteel de enige mogelijkheid tot genezing. Huidige behandelstrategieën kunnen de ziekteprogressie slechts vertragen, maar niet volledig stoppen of omkeren. PAH-CHD is hiermee nog steeds een dodelijke ziekte die al op jonge leeftijd kan leiden tot rechter hart falen (RHF) en de dood.

Samengevat: Er is nog onvoldoende kennis over de mechanismen van (de progressie van) longvaatremodellering in PAH-CHD. We kunnen de ziekteprogressie bovendien nog niet betrouwbaar volgen in de individuele patiënt en weten niet wanneer de ziekte irreversibel is. De progressie van irreversibele PAH-CHD, evenals alle andere vormen van PAH, kan momenteel slechts beperkt worden vertraagd, en niet worden genezen.

#### ACHTERGROND

PAH uit zich meestal al op jonge leeftijd en de gemiddelde levensverwachting is momenteel 3-5 jaar. PAH kent verschillende oorzaken: erfelijk, medicatie/toxinegeïnduceerd of als complicatie van aangeboren hartafwijkingen (CHD) of infecties zoals HIV; soms blijft de oorzaak onbekend. Alle vormen van PAH worden gekenmerkt door eenzelfde patroon van progressieve en irreversibele vaatafwijkingen in de longarteriën, welke zorgen voor een stijging van de longvaatdruk en weerstand. Het klinisch probleem dat PAH momenteel geeft is tweeledig: Het primaire ziekteproces (vasculaire remodeling) kan 1) onvoldoende betrouwbaar worden beoordeeld en 2) slechts beperkt worden geremd. De sleutel in het oplossen van dit probleem ligt primair in het beter begrijpen van de mechanismen betrokken bij de progressie en reversibiliteit van vasculaire remodeling in PAH.

PAH-CHD, of flow-PAH is een ideale subklasse van PAH om ziekteprogressie en reversibiliteit te onderzoeken door 2 unieke eigenschappen:

- 1) PAH-CHD is de enige vorm waarbij we de pathogene trigger kennen en kunnen kwantificeren.
- 2) PAH-CHD is de enige vorm die een reversibele fase kent.

1) De vaatafwijkingen in PAH-CHD ontwikkelen als gevolg van een toegenomen of abnormale flow en druk in de pulmonale circulatie, die voorkomt bij veel aangeboren hartafwijkingen. Eerder in ons lab is in ratten aangetoond dat een toegenomen pulmonale flow leidt tot verdikking van de spierlaag (mediahypertrofie) om de longarteriën (vroeg stadium PAH). Bij ziekteprogressie zien we dat ook de endotheellaag (intima) gaat verdikken, waardoor het vat dichtgroeit (neo-intimalaesie, eind stadium PAH) [van Albada, Dickinson, resp. 2008, 2011].

De meest ingrijpende veranderingen op cellulair niveau vinden plaats in de endotheelcellen van deze (neo)intima. [REDACTED]

2) Ook een reversibele fase is vooralsnog uniek voor PAH-CHD. Het normaliseren van abnormale pulmonale hemodynamiek (de trigger), door het corrigeren van het hartdefect, kan in een vroeg, reversibel stadium PAH leiden tot regressie van de vaatafwijkingen en volledig klinisch herstel. Wanneer de correctie van het hartdefect plaatsvindt in het irreversibele stadium, zal de longvaatziekte desondanks voortschrijden. Deze laatste groep kinderen blijkt een nog slechtere prognose te hebben dan wanneer het hartdefect open gelaten wordt. Beter begrip van het effect van hemodynamische normalisering op de pulmonale vaatremodelering in verschillende ziektestadia kan helpen in het ontrafelen van de mechanismen die specifiek betrokken zijn bij reversibiliteit. Dit voorkomt dat kinderen met PAH-CHD onterecht niet of wel worden geopereerd. Tevens kan dit leiden tot nieuwe targets voor farmacologische interventie in PAH-CHD en mogelijk in alle overige vormen van PAH.

Essentieel voor de timing van deze farmacologische interventie (in PAH) of van hemodynamische normalisatie (in PAH-CHD), is dus een betrouwbare inschatting van het ziektestadium. De beoordeling hiervan wordt momenteel gemaakt op basis van een combinatie van klinische parameters en hemodynamische onderzoeken zoals echografie en rechter hart katheterisatie. Geen van deze technieken kan echter betrouwbare informatie geven over het primaire ziekteproces en haar reversibiliteit. PET-CT onderzoek zou een mogelijkheid kunnen bieden om vaatremodelering in vivo in beeld te brengen. De eerste studies met de conventionele 18F-FDG PET tracer in PAH zijn reeds gepubliceerd [marsboom, zhao, resp. 2011, 2014] en geven aanleiding tot het testen van nieuwe PET tracers, specifiek voor vasculaire remodelering.

#### VOORGAAND ONDERZOEK:

Er is reeds 10 jaar ervaring met diermodellen voor PAH-CHD op de afdeling CCH-UMCG [van Albada, Dickinson 2005-2014]. [REDACTED]

[REDACTED] De klinische, hemodynamische en histologische progressie van flow-PAH is inmiddels goed in kaart gebracht. [REDACTED]

[REDACTED] Vroeg stadium MCT/flow-PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door geïsoleerde mediahypertrofie en een slanke intimalaag met kenmerken van hyperproliferatie en verhoogde apoptose. Gevorderd stadium PAH wordt histologisch gekarakteriseerd door mediahypertrofie en een verdikte (neo)intima laag, met kenmerken van apoptose-resistentie. Beide fasen zijn overeenkomstig met de humane PAH-CHD. Dit model (Ia) wordt nogmaals beschreven onder paragraaf 3.4.2.

#### Context

Centraal bij dit onderzoek staat het doel om de prognose en kwaliteit van leven van patiënten met PAH te verbeteren. [REDACTED]







subsidie. Op dit moment is dat o.a. de volgende toegewezen subsidie:

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Er bestaat reeds een rat-model voor flow-PAH ██████ in ons lab.

Uit het bloed of weefsel van deze diermodellen kunnen we cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfologische mechanismen te karakteriseren.

Op deze modellen kunnen we diagnostische interventies toepassen, zoals bloedtesten, echografie, telemetrie, PET-CT, en hartcatheterisatie.

Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen, enerzijds chirurgisch (bijvoorbeeld longtransplantatie), anderzijds medicamenteus. Dit helpt ons aan de ene kant om de (ir)reversibiliteit van de geremodeleerde longvaten of rechter hartkamer te testen en te begrijpen wat voor mechanismen hier een rol in spelen, en ook om nieuwe medicijnen te ontwikkelen.

---

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

Onderzoeksstrategie.

Om de doelen zoals beschreven in paragraaf 3.2 te bereiken, zetten wij de volgende lijnen uit binnen dit project. De verschillende lijnen hangen sterk met elkaar samen.

1. Vasculaire celstudies: cellen geïsoleerd uit dieren met verschillende stadia van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia (flow-PAH in de wistar rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD) om de cellen uit te oogsten. De cellen kunnen we doorkweken om 1) gen- en eiwitexpressie te karakteriseren ██████ en 2) farmacologische compounds te testen, die specifiek aangrijpen op het veranderde fenotype dat de endotheelcel heeft verkregen tijdens ziekteprogressie. Deze drugscreen wordt uitgevoerd in samenwerking met het LUMC. Hieruit zullen een aantal potentiële farmaca volgen, waarvan de beste in vivo getest zullen worden in lijn 5.
2. Pathobiologiestudies. Ontrafelen van de mechanismen of factoren die ten grondslag liggen aan het ontstaan en de progressie van PAH. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model Ia/b (flow-PAH in wistar en/of lewis rat, een model voor het natuurlijk beloop van PAH-CHD). Het weefsel en bloed van de ratten wordt gebruikt om de spatiotemporele expressie (histologie) of waarde als biomarker (bloed) van nieuwe targets te onderzoeken. Dit continueert reeds 10 jaar lopend onderzoek naar de pathobiologie van PAH in ons lab. Op basis van deze lijn zal tevens worden bepaald welke PET-tracers in lijn 4 gebruikt zullen worden. De aangrijppunten van de potentiële tracers zullen voorafgaand aan de experimenten in lijn 4 histologisch worden gevalideerd in het longweefsel uit deze lijn.
3. Reversibiliteitsstudies. Het karakteriseren van de (ir)reversibiliteit van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van model II ██████, een model voor het beloop van PAH-CHD na sluiten van de cardiale shunt). Verschillende stadia van PAH worden geïnduceerd in de ratten. ██████ ██████ De zieke longen komen zo in een hemodynamisch genormaliseerde omgeving. Dit model bootst sluiting van de cardiale shunt na bij kinderen met PAH en een congenitale hartafwijking. Dit ratmodel geeft ons de mogelijkheid te bepalen (primair op long histologisch niveau) in welk stadium de ziekte nog reversibel is, en welke mechanismen betrokken zijn bij regressieve, dan wel progressieve ziekte. De targets die specifiek geassocieerd zijn met regressieve / progressieve ziekte kunnen dienen als biomarker of als aangrijppunt voor

farmacologische interventie, welke prospectief kunnen worden getoetst in lijn 5.

4. Imagingstudies. Imaging en stadiëring van de ziekte. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de ziekte een PET-CT scan krijgen. We testen al bestaande tracers die hun oorsprong hebben in de oncologie en in PAH een nieuwe toepassing zouden kunnen vinden.

5. Interventiestudies. Interventie op targets die gevonden worden in de Celstudies, Pathobiologiestudies en Reversibiliteitsstudies. De interventiestudies kunnen worden getest in model I en II ( ).

AD1 en 2) Er wordt reeds 10 jaar onderzoek gedaan naar de pathobiologie van PAH in model Ia (flow-PAH). Uit het bloed of weefsel van deze diermodellen kunnen we (endotheel)cellen isoleren en histopathologisch onderzoek doen om genetische, moleculaire, cellulaire, histomorfolologische mechanismen te karakteriseren. Ook zal de rol van geslacht worden onderzocht door model Ia (flow-PAH) ook in vrouwelijke ratten toe te passen.

AD4) Op deze modellen kunnen we ook diagnostische interventies toepassen. Diagnostische interventies die reeds geprotocolleerd zijn, zijn elektrocardiogram (ECGs), echocardiografie (ECHO), rechter hartcatheterisatie (R-CATH). Dit is ondersteunende diagnostiek. Ook nieuwe diagnostische technieken, zoals PET-CT kunnen worden toegepast in deze modellen.

AD5) Op deze modellen kunnen we vervolgens ook therapeutische interventies toepassen. De targets voor interventie worden gevonden in de studies naar pathobiologie en reversibiliteit die zowel in dit onderzoek als in het onderzoeksconsortium PHAEDRA gevonden worden. De medicatie kan in beide modellen ( ) gegeven worden

---

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.

Samenhang tussen onderzoekslijnen (zie 3.4.2):

In lijn 1 wordt de ziekte op celniveau bestudeerd en kan gezocht worden naar targets voor interventie. Deze targets kunnen met specifieke farmaca gestimuleerd of geremd worden. Dezelfde targets worden daarna bestudeerd op histologisch niveau in lijn 2, Hierin worden tevens klinische, hemodynamische en histologische progressie van PAH en RHF gekarakteriseerd en gestadieerd. Deze karakterisatie is onder andere nodig voor de correlatie van de gegevens uit de imagingstudies, lijn 4. In de Reversibiliteitsstudies, lijn 3, wordt vervolgens het effect van normalisering van de hemodynamiek op de longvaatziekte bestudeerd, of het effect van longtransplantatie op het hart. In de interventiestudies, lijn5, wordt gebruik gemaakt van de targets gevonden in de cel- en pathobiologie en reversibiliteitsstudies. [REDACTED]

#### Fasering:

De eerste experimenten worden uitgevoerd onder Lijn 1 en 2. [REDACTED]

[REDACTED]. De gevonden eitwit/genexpressiepatronen uit lijn 1 kunnen vervolgens specifiek op histologisch niveau worden gevalideerd in de vaatlaesies van longen met PAH (lijn 2).

De gegevens uit lijn 1 en 2 vormen de basis voor experimenten uit lijn 3 en 4. [REDACTED]

Lijn 1,2 en 3 leveren targets op voor farmacologische interventie en vormen hiermee de basis voor lijn 5. Bovendien kan het effect van medicatie in de proeven uit lijn 5, evt in vivo gevolgd worden door gebruik te maken van de resultaten uit lijn 4.

#### Go/No-Go:

##### Algemeen:

Binnen het PHAEDRA consortium, waarin dit onderzoek wordt uitgevoerd, worden alle lopende onderzoekslijnen eens per kwartaal geëvalueerd. Hierbij zullen ook tijdens lopende projecten (naar aanleiding van eventuele problemen of vertraging in wetenschappelijke progressie) Go/No-go punten geformuleerd worden.

- Lijn 1+2) De onderzoeksmethode en procedures uit lijn 1 en 2 zijn reeds gevalideerd en lopend. In deze lijn worden geen belemmeringen voor de progressie van het onderzoek verwacht.

- Lijn 3) Voor de reversibiliteitsstudies uit lijn 3 wordt momenteel een pilot uitgevoerd om o.a. de haalbaarheid van de procedures te toetsen. [REDACTED]

- Lijn 4) Ook voor de imagingstudies in lijn 4 wordt momenteel een pilot uitgevoerd, om de technische haalbaarheid en het onderscheidend vermogen van PET-CT in flow-PAH te toetsen. [REDACTED]

[REDACTED] Dit zal per tracer overlegd worden binnen het PHAEDRA consortium en met de afdeling nucleair geneeskundige beeldvormende technieken van het UMCG.

- Lijn 5) De potentie van de te kiezen farmacologische interventie wordt eerst getoetst in celstudies. Hierna zal deze in de diermodellen I en II worden



toegepast. Een No-Go punt zou hierbij kunnen zijn: disproportioneel lijden als gevolg van een onverwachte bijwerking van het farmacon. Tevens is het mogelijk (althans tegen de verwachting in) dat er geen geschikt farmacon gevonden wordt in de drugscreen (lijn1). [REDACTED]  
[REDACTED] Bij onvoldoende verwachte potentie van een farmacon zal deze lijn vervallen. Het vinden en evalueren van een geschikt farmacon voor de behandeling van PAH is een hoofddoel van het PHAEDRA consortium. De overwegingen voor het kiezen en evalueren van een geschikt farmacon zullen binnen het consortium uitgebreid worden besproken.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	████████
2	████████
3	
5	
6	
7	
8	
9	
10	

DEB 11 | 15700129

afu 25/6/2015 en op 7/7/2015  
bank 56999666



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
HPC:FA 29  
9713 AV Groningen  
Rijksuniversiteit Groningen

GR 8000

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

## Factuur

Factuurdatum 08 juni 2015  
Vervaldatum 08 juli 2015  
Factuurnummer 15700129  
Betreft Factuur Aanvraag projectvergunning dierproeven

### Omschrijving

Betaling leges projectvergunning dierproeven  
Betreft aanvraag AVD105002015129

### 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.

2x ontvangen odx of 77k015

IBAN	Rekeningcode	Munt	Bedrag	Valutatdatum	Boekdatum en -tijd	Transactiesoort	Klantreferentie	Omschrijving
NL28RBO50569996066	EZ_RVO 6066	EUR	741	06-30-15	06-30-15	654	170-811-47-41009	/IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C ENTRUM GRONINGEN/REMI/201570134/EREF/170-811-47-41009
NL28RBO50569996066	EZ_RVO 6066	EUR	741	06-29-15	06-29-15	654	620946032	//ADDR/NISTELROOISE BAAN 3 5374RE SCHAUW NEDERLAND /IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C ENTRUM GRONINGEN/REMI/201570128/EREF/170-807-1-41009
NL28RBO50569996066	EZ_RVO 6066	EUR	741	06-25-15	06-25-15	654	170-807-67-41009	/IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C ENTRUM GRONINGEN/REMI/15700129/EREF/170-807-67-41009
NL28RBO50569996066	EZ_RVO 6066	EUR	741	06-25-15	06-25-15	654	170-807-68-41009	/IBAN/NL37INGB0651735661/BIC/INGBNL2A/NAME/UNIVERSITAIR MEDISCH C ENTRUM GRONINGEN/REMI/201570130/EREF/170-807-68-41009

201570134  
201570128  
201570129  
201570130

NR AVD905002015121

12

[redacted] [redacted] [redacted]  
Van: [redacted]  
Verzonden: woensdag 8 juli 2015 10:00  
Aan: ZBO-CCD; [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted] [redacted]  
Onderwerp: Dierproef ontvangsten 7-7-2015

EREF IBAN/NL45INGB0651575079BIC/INGBNL2ANAME/UMCG TAV FIN ADM HPC LB25/REMI/15700129EREF100-1248-327-113586 (741 euro)

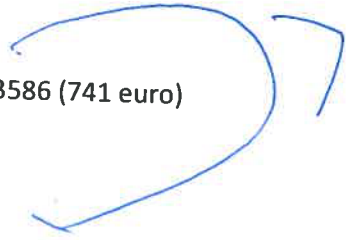
Met vriendelijke Groet,

[redacted] [redacted]  
Medewerker Financiële administratie

.....  
**Team Apparaatsadministratie**  
**Financien en Control**  
**Rijksdienst voor Ondernemend Nederland**  
.....

T [redacted] [redacted]  
[redacted]  
<http://www.rvo.nl>

2x ontvangen  
per 25/6 ook  
15700129



**Van:** ZBO-CCD  
**Verzonden:** maandag 15 juni 2015 16:08  
**Aan:** [redacted]@rug.nl'  
**CC:** [redacted]@umcg.nl'  
**Onderwerp:** gewijzigd aanvraagnummer AVD105002015129

Geachte [redacted]

In het automatische systeem van de CCD is door een technische storing uw aanvraag nummer AVD105002015129 getiteld: " pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" vervangen voor aanvraagnummer AVD105002015145. U heeft dan ook per abuis nogmaals een ontvangstbevestiging en factuur ontvangen, deze kunt u als niet verzonden beschouwen. Wij houden uw aanvraag onder nummer AVD105002015129 in behandeling,

Met vriendelijke groet, [redacted]

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

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

Geachte CCD,

Groningen, 9-06-2015

*Betreft:*

*Respons aanvulling aanvraag projectvergunning dierproeven 8-6-2015*

Vraag 1. Looptijd project.

De looptijd van het project is van 01-08-2015 tot 01-08-2020. Dit is inderdaad foutief ingevuld op het formulier administratieve gegevens en is aangepast. Voor de uitvoering van de dierproeven in het voorgestelde project, met name de fasering in acht nemend, denken wij zeker 5 jaar nodig te hebben.

Vraag 2. Gebruik beide geslachten in dierproeven.

Uit de klinische studies uitgevoerd bij mensen met pulmonale arteriële hypertensie (PAH) blijkt dat er aanzienlijke verschillen zitten in ziekteontwikkeling tussen vrouwen en mannen. Vrouwen hebben een grotere kans om PAH te ontwikkelen; mannen overlijden sneller bij reeds gemanifesteerde PAH. De rol van geslachtshormonen is nog onduidelijk maar wordt momenteel geëxploreerd. Zie hiervoor bijvoorbeeld onderstaande review (1). Hierdoor hebben we tot nog toe alleen mannelijke ratten gebruikt voor onze experimenten en zullen de toekomstige experimenten ook met mannelijke ratten worden uitgevoerd.

De rol van geslacht op de progressie van PAH is geen primair onderzoeksdoel van deze aanvraag. Het is echter goed mogelijk en naar onze mening zowel wetenschappelijk gezien van belang als maatschappelijk van nut wegens het door u aangedragen argument, om in onze experimenten ook vrouwelijke ratten te includeren. We hebben dit besproken en besloten vrouwelijke ratten te includeren in een pilot studie om de rol van geslacht op ziekteprogressie te karakteriseren. Wanneer er geen significant effect van geslacht op de ziekteontwikkeling is, zal overwogen worden de overige experimenten onder bijlage 1 ook in vrouwelijke ratten uit te voeren.

Ik heb dit aangepast in de projectaanvraag dierproeven (onder 3.2: doel 1/AD 1; 3.4.2 onderzoeksstrategie) en bijlage 1 (onder A: experimentele aanpak).

Ik hoop uw vragen zo voldoende te hebben beantwoord.  
Bedankt voor de suggestie,

Met vriendelijke groet,

Namens [REDACTED]

[REDACTED]  
Arts-onderzoeker [REDACTED] UMC Groningen.

(1) Martin Yvette N YN. Sex differences in the pulmonary circulation: implications for pulmonary hypertension. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology 2014-5;306(9):1253-64.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
HPC: FA 29  
9713 AV Groningen

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.centralecommissiedierproe  
ven.nl

T 0900-2800028 (10 ct /min)  
ZBO-CCD@minez.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

**Uw referentie**  
-

**Bijlagen**  
1

Datum 24 juni 2015  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 juni 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven digitaal ontvangen. Het gaat om uw project "Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" met aanvraagnummer AVD105002015129. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 9 juni 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld op basis van door het secretariaat van de CCD gestelde vragen.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag onder voorwaarde goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna de wet). U kunt met uw project "Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. 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- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens in het colofon.



**Datum**  
24 juni 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015129

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

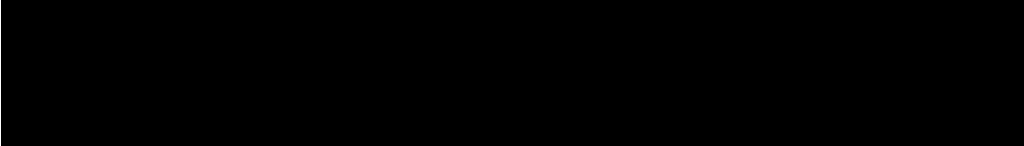
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

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: - DEC-advies  
- Weergave wet- en regelgeving



## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Adres: A. Deusinglaan 1 HPC: FA29  
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 augustus 2015 tot en met 31 juli 2020, voor het project "Pathobiologie, reversibiliteit en behandeling van pulmonale arteriële hypertensie" met aanvraagnummer AVD105002015129, volgens advies van dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 9 juni 2015.
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 juni 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 2 juni 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2015, ontvangen op 2 juni 2015.
  - d. Aanvullingen ontvangen op 9 juni 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Dierproef 1: Flow- PAH  Pilot studie om de rol van geslacht op ziekteprogressie te onderzoeken	Ratten Inbred/ outbred	500 mannelijk  Aantal vrouwelijke dieren dat nodig is om een vergelijk te maken met de representatieve mannelijke groep	matig
Dierproef 2: PAH-LTx	Ratten inbred	450+ max 15% Uitval= 525	matig

### Aanvullende voorwaarden:

Resultaten van de pilotstudie om rol van geslacht op ziekteprogressie te onderzoeken worden teruggekoppeld met de IvD. In het geval er geen verschil is tussen mannelijke en vrouwelijke dieren worden voor vervolgstudies in dit project beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt.

In Artikel 10, eerste lid, onder a, Wet op de dierproeven, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze

vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **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 blijvende schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

Uit artikel 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.