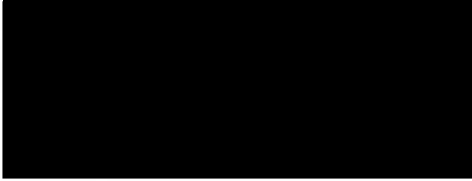




Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118, 2509 AC Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118
2509 AC Den Haag
www.centralecommissiedierproe
ven.nl

T 0900 2800028 (10 ct/min)
wob-ccd@rvo.nl

Onze referentie
B.2.17.001

Uw referentie

Briefkenmerk
CCD-2018-133

Bijlage(n)
1

Datum **7 AUG 2018**
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.17.001 (W16-21S)

Geachte heer 

Bij brief van 12 januari 2017, ontvangen op 13 januari 2017, heeft u, namens uw cliënte mevrouw  een bezwaarschrift (met kenmerk 2017/002) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 5 december 2016 met kenmerk W16-21S.

Verloop van de procedure

- Op 18 juli 2016 ontvingen wij per e-mail het verzoek op basis van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van uw cliënte om toezending van documenten die betrekking hebben op een achttal verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek;
- Bij besluit van 5 december 2016 is op dit Wob-verzoek beslist;
- Vervolgens ontvingen wij op 13 januari 2017 uw bezwaarschrift, gericht tegen voornoemd besluit;
- De ontvangst van uw bezwaarschrift hebben wij bij brief van 24 januari 2017 bevestigd;
- Op 24 januari 2017 is het Wob-besluit tezamen met de bijbehorende documenten op de website van de CCD geplaatst;
- Middels de brief van 21 februari 2017 hebben wij de termijn om te beslissen op uw bezwaarschrift met zes weken verdaagd;
- Op 28 maart 2017 hebben wij per e-mail aangekondigd dat wij in de onderhavige zaak een hoorzitting met u willen plannen. Voorts hebben wij u in deze e-mail verzocht om uw gronden van bezwaar (eventueel) aan te vullen, nu de documenten van Wob-besluit W16-21S sinds 24 januari 2017 op de website van de CCD staan gepubliceerd. Wij hebben u voor de

- eventuele aanvulling van de gronden een termijn tot 11 april 2017 verleend. Van deze mogelijkheid heeft u geen gebruik gemaakt;
- Bij brief van 2 mei 2017 hebben wij u de uitnodiging voor de hoorzitting op 16 mei 2017 gestuurd. Daarnaast hebben wij op die datum de geanonimiseerde zienswijzen van derde belanghebbenden toegestuurd;
 - Voorts heeft op 16 mei 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting is als bijlage bij dit besluit gevoegd. Tijdens de hoorzitting heeft u een aantal nieuwe bezwaargronden aangevoerd. Gesteld wordt dat met het zodanig laat kenbaar maken van nieuwe gronden van bezwaar derde belanghebbenden worden belemmerd om daarop adequaat te reageren, waardoor de goede voortgang van de procedure is belemmerd;
 - Derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

Beslissing

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond en gedeeltelijk ongegrond. Dit betekent dat het besluit van 5 december 2016 gedeeltelijk wordt herroepen en gedeeltelijk blijft gehandhaafd. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

Ten aanzien van de ontvankelijkheid

Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 5 december 2016. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

Derde belanghebbenden

Aan de derde belanghebbenden is gevraagd om gehoord te willen worden. De derde belanghebbenden hebben hier geen gebruik van gemaakt. Voor het overige zijn de zienswijzen van de derde belanghebbenden uit de primaire fase u voor de hoorzitting, anoniem, maar verbonden aan het NTS-nummer, verstrekt.

Bezwaren

Hieronder worden uw bezwaargronden kort toegelicht.

Uw bezwaren zien toe op meerdere punten. Allereerst is aangegeven dat de data van vergaderingen van de CCD niet kunnen worden geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob (hierna: **bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het niet kenbaar maken van de weigerings- of uitzonderingsgronden per specifieke passage (hierna: **bezwaar 2**).

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (hierna: **bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar



dierenrechtenactivisme. Bovendien hebben betrokkenen volgens u op geen enkele wijze inzichtelijk gemaakt dat zij in de afgelopen jaren zijn geconfronteerd met ontoelaatbare bejegeningen van (dierenrechten)activisten (hierna: **bezwaar 4**).

Voor wat betreft vergunning 2016513 heeft u aangegeven dat uit het besluit niet volgt of namen en gegevens van rechtspersonen worden geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e en g van de Wob. Tijdens de hoorzitting is naar voren gekomen dat uit de documenten is gebleken dat de naam van de vergunninghouder niet is geweigerd, waardoor tegen de weigeringen in deze vergunning geen bezwaar bestaat.

U geeft aan dat gegevens op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob worden geweigerd, maar dat vergunninghouders in hun zienswijzen niet aannemelijk maken dat zij zijn geconfronteerd met incidenten. Deze bezwaargrond hangt samen met **bezwaar 4** en zal in dit gedeelte worden behandeld.

Aangaande vergunning 2016514 geeft u aan dat informatie is geweigerd, omdat hierover nog niet is gepubliceerd, maar u bestrijdt dat met openbaarmaking van deze informatie een derde het onderzoek kan nadoen. Op geen enkele wijze wordt dit volgens u aannemelijk gemaakt. Tijdens de hoorzitting heeft u bovendien aangegeven dat openbaarmaking van deze informatie volgens u niet leidt tot onevenredige benadeling. Deze grond zal onder **bezwaar 3** worden behandeld.

Tenslotte heeft u in uw bezwaarschrift aangegeven dat de stelling dat bij openbaarmaking gegevens niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten geen hout snijdt. Ook het argument dat er nog patent moet worden aangevraagd, houdt volgens u geen stand. Onderzoeksstrategieën zijn naar uw mening bovendien niet patentwaardig (hierna: **bezwaar 5**).

Tijdens de hoorzitting heeft u aanvullend het volgende aangegeven: tegen de weigeringen in de vergunningen 2016513, 2016525, 2016527, 2016531, 2016542 en 2016543 bestaat geen bezwaar. In vergunning 2016467 worden bepaalde cellen, omschrijvingen van dieren, de mate van ongerief en het nummer van een DEC-aanvraag ten onrechte geweigerd. Deze grond zal onder **bezwaar 3** worden behandeld.

Tot slot wordt door u verzocht om heroverweging van het besluit en om alsnog alle openbare informatie te verstrekken. Tevens wordt verzocht om toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb.

Ten aanzien van bezwaar 1

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

U heeft aangegeven dat data van vergaderingen ten onrechte zijn geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Dergelijke data van vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen. Ook de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen is geen persoonlijke beleidsopvatting.

Tijdens de hoorzitting op 16 mei 2017 heeft u verduidelijkt dat het onderhavige Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de aanvragers en de CCD (zie het bijgevoegde verslag). Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend is. Uit de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: de Afdeling) van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) blijkt uit rechtsoverweging 2.2: *"Zoals eveneens volgt uit de geschiedenis van de totstandkoming van de Wob (Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 14 en 38) en zoals de Afdeling evenzeer eerder heeft overwogen (onder meer in de uitspraak van 18 augustus 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BN4268), beoogt artikel 11, eerste lid, van de Wob ter bescherming van de vrije meningsvorming te verzekeren dat de bij ontwikkeling van beleid van een bestuursorgaan betrokken personen in alle vrijheid en in een vertrouwelijke sfeer hun gedachten en opvattingen kunnen uiten zonder vrees voor gezichtsverlies. In dat kader beschermt deze bepaling ook de opvattingen van hen die van buiten in de sfeer van het interne beraad zijn betrokken."*

Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Bovendien bevat het advies meningen, voorstellen en inschattingen van de opsteller met betrekking tot een bestuurlijke aangelegenheid. Derhalve bevat het advies persoonlijke beleidsopvattingen. De feiten die in het document zijn opgenomen, zijn zozeer met de persoonlijke beleidsopvattingen verweven, dat het niet mogelijk is om deze daarin te scheiden. De CCD verwijst hierbij naar de zeer recente uitspraak van de Afdeling van 18 juli 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:2424). Hiervoor kan eveneens aansluiting worden gezocht bij de eerder genoemde uitspraak van de Afdeling van 21 december 2016 en de uitspraak van de Afdeling van 24 juni 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:1942).

Tenslotte volgt uit deze uitspraak dat artikel 11 lid 1 van de Wob bestuursorganen gebiedt om geen informatie over persoonlijke beleidsopvattingen openbaar te maken uit documenten die ten behoeve van intern beraad zijn opgesteld en dit artikel laat geen ruimte voor een belangenafweging.

Uit de uitspraak van de Afdeling van 28 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3478) volgt voorts dat het bestuursorgaan dat verantwoordelijk is voor de betrokken bestuursvoering bevoegd is om, los van de bereidheid van betrokkenen om in te stemmen met openbaarmaking, de informatie niet te verschaffen (*Kamerstukken II 986/87, 19 859, nr. 3, blz. 38*). Zoals de Afdeling eerder heeft overwogen (in de uitspraak van 3 juni 2009, ECLI:NL:RVS:2009:BI6049) kan de kring van betrokkenen een rol spelen bij de beantwoording van de vraag of een geanonimiseerde versie van de persoonlijke beleidsopvattingen kan worden verstrekt.

In het onderhavige geval betreft het een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig



worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld, welke op de website van de CCD – www.centralecommissiedierproeven.nl – staan gepubliceerd. Door de zoekterm 'verslag' in te voeren, zijn deze verslagen eenvoudig te achterhalen. Uit de verslagen volgt wanneer welke aanvraag – onder vermelding van het NTS-nummer – in de vergadering is besproken. Op deze wijze is deze informatie reeds openbaar.

Uit het bestreden besluit volgt niet dat wij voornoemde informatie hebben geweigerd, vanwege de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen. Wij kunnen u derhalve niet volgen in uw redenering.

Ten aanzien van bezwaar 2

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

Bij het bestreden besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob-verzoek. De documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) is (zijn) toegepast. Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016 (ECLI:NL:RBAMS:2016:9336).

Voor wat betreft de weggelakte persoonsgegevens kan gelet op onder meer de opbouw en context van de documenten worden opgemaakt om wat voor soort gegevens het gaat. Daaruit kan worden afgeleid dat de persoonsgegevens en de hiertoe herleidbare informatie zijn geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling (artikel 10 lid 2 sub g van de Wob). Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD volledig is geweigerd op grond van artikel 11 van de Wob.

Het is dus zonder meer duidelijk op basis van welke uitzonderingsgrond is geweigerd een bepaalde passage of zinsnede openbaar te maken.

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij iedere vergunning nagenoeg vergelijkbaar. Meerdere documenten betreffen formulieren of zijn opgemaakt in een vaste opbouw, zodat het per document motiveren van de weigeringsgrond zou leiden tot herhaling, hetgeen geen doel dient. Dit geldt ook in het geval het niet gaat om geheel gelijksoortige documenten. Verwezen wordt naar rechtsoverweging 3.2 van de uitspraak van de Afdeling van 2 september 2015, ECLI:NL:RVS:2015:2779.

Ten aanzien van bezwaar 3

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels.

In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt.

Hierna wordt per vergunning – indien informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob en het geen namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen betreft of indien hierover twijfel bestaat – het oordeel van de CCD weergegeven over het weigeren van de betreffende informatie.

Uit het bestreden besluit en de bijbehorende documenten volgt dat in vergunning 2016467 in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 en 16 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 8 en 9 gaat het hierbij slechts om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en om handtekeningen. Deze gegevens zijn naar het oordeel van de CCD terecht geweigerd.

In de documenten 2, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14 en 16 staan concurrentiegevoelige gegevens, welke naar het oordeel van de CCD terecht zijn geweigerd. Zoals uit het bestreden besluit volgt, is een specifieke combinatie geweigerd, is een nieuwe onderzoekslijn geweigerd en zijn cellen, cel aantallen en specifieke markers geweigerd. Deze gegevens zijn uniek en kenmerkend voor het betreffende onderzoek. Bovendien geven deze gegevens inzicht in de totstandkoming van het onderzoeksresultaat. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers zwaarder moet wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van deze concurrentiegevoelige gegevens. Hierbij kan aansluiting worden gezocht bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 3 juli 2017 (ECLI:NL:RBGEL:2017:3427).

Zoals uit de documenten volgt, zijn de documenten 2 en 10, 4 en 12, 5 en 13 en 6 en 14 vrijwel identiek aan elkaar, waardoor de weigeringen en de hiervoor opgenomen motivering ook (vrijwel) identiek zijn. Op basis van het voornoemde blijft deze informatie geweigerd.

Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat in vergunning 2016467 bepaalde cellen, omschrijvingen van dieren, de mate van ongerief en het nummer van een DEC-aanvraag ten onrechte worden geweigerd. Op het weigeren van specifieke cellen is hiervoor reeds ingegaan. Voor wat betreft de omschrijvingen van dieren is de CCD van oordeel dat deze gegevens niet zijn geweigerd. In onderdeel B 'De dieren' van de documenten 4, 5, 6, 12, 13 en 14 is weliswaar informatie geweigerd, maar dit betreft niet de omschrijvingen van dieren, maar de hiervoor genoemde concurrentiegevoelige informatie.

De CCD is van oordeel dat ook de mate van ongerief in de documenten niet is geweigerd. Bovendien is de mate van ongerief middels de niet-technische



samenvatting op de website van de CCD reeds openbaar. In document 12 is onder het kopje over ongerief een woord geweigerd, maar dit betreft het soort dier en niet de mate van ongerief.

De CCD kan u voorts niet volgen in uw redenering dat het nummer van een DEC-aanvraag is geweigerd. Wellicht doelt u op hetgeen bovenaan in document 2 (pagina 13 van het geheel) en bovenaan in document 10 (pagina 66 van het geheel) staat. Dit betreft echter de naam van de betrokken onderzoeker, welke op basis van reeds genoemde redenen is geweigerd.

In de vergunningen 2016513, 2016525, 2017527, 2016542 en 2016543 is geen informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Tijdens de hoorzitting heeft u bovendien aangegeven dat tegen de weigeringen in deze vergunningen geen bezwaar bestaat. Deze informatie blijft derhalve geweigerd.

Uit het bestreden besluit en de bijbehorende documenten volgt dat voor wat betreft vergunning 2016514 slechts in document 2 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Een gedeelte van de geweigerde informatie in document 2 betreft referenties naar bij het onderhavige onderzoek betrokken personen. Tijdens een eerdere hoorzitting heeft u aangegeven dat u zich kunt vinden in het weigeren van referenties naar onderzoekers die ook bij dit onderzoek zijn betrokken. De CCD is met u van oordeel dat deze gegevens geweigerd dienen te blijven.

Aangaande vergunning 2016514 geeft u voorts aan dat informatie is geweigerd, omdat hierover nog niet is gepubliceerd, maar u bestrijdt dat met openbaarmaking van deze informatie een derde het onderzoek kan nadoen. Op geen enkele wijze wordt dit volgens u aannemelijk gemaakt. Bovendien leidt openbaarmaking van deze informatie volgens u niet tot onevenredige benadeling.

In uw bezwaarschrift en tijdens de hoorzitting heeft u verwezen naar de uitspraak van de rechtbank Almelo van 10 januari 2007 (ECLI:NL:RBALM:2007:AZ5879) aangaande een onzekere toekomstige gebeurtenis. De CCD heeft echter tijdens de hoorzitting – zoals volgt uit het bijgevoegde verslag – geoordeeld dat geen parallel wordt gezien tussen de betreffende uitspraak en de (geweigerde) informatie. Tijdens de hoorzitting is dit niet weersproken.

De overige geweigerde informatie in dit document betreft een combinatie van het type kunststof, de specificaties van het kunststof en de wijze van gebruik van dit type kunststof. Blijkens de vergunninghouder is dit een unieke combinatie waar nog niet eerder over is gepubliceerd. Bovendien leidt openbaarmaking in deze fase van het onderzoek ertoe, dat geen patent meer kan worden aangevraagd wanneer een (gedeelte van het) onderzoek reeds openbaar is. De CCD kan de vergunninghouder volgen in haar redenering dat sprake is van een unieke combinatie. Daarnaast werkt het voornemen van de onderzoeker om patent aan te vragen signalerend voor het belang van het onderzoek en daarmee om de te weigeren informatie geweigerd te houden.

De CCD is van oordeel dat nu het onderzoek nog grotendeels moet worden uitgevoerd, er dus nader onderzoek nodig is en er nog geen publicaties zijn geweest over het betreffende onderzoek, het niet wenselijk is dat onder andere

een unieke combinatie en de strategie voor de komende tijd al in deze fase van het onderzoek wordt geopenbaard. Onderdelen worden nog getest en pas na afloop van de uitgevoerde proeven worden resultaten duidelijk en dus ook of bescherming middels intellectueel eigendomsrecht mogelijk is. De betreffende gegevens blijven middels dit besluit geweigerd.

Blijkens het bestreden besluit en blijkens de inventaris behorend bij vergunning 2016531 is weliswaar informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, maar betreft het slechts namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. In document 2 is een referentie met de naam van een bij het onderzoek betrokken onderzoeker geweigerd. Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat u tegen de weigeringen in deze vergunning geen bezwaar heeft. Deze gegevens blijven derhalve geweigerd.

Ten aanzien van bezwaar 4

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

In dit kader zoekt de CCD aansluiting bij de uitspraak van de Afdeling van 31 januari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:321). Uit deze uitspraak volgt dat het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zich verzet tegen openbaarmaking van namen van medewerkers die niet wegens hun functie in de openbaarheid treden, tenzij de indiener van het Wob-verzoek aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van openbaarheid in een concreet geval zwaarder weegt.

Voor de CCD staat voldoende vast dat op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarheid in dit concrete geval zwaarder weegt. De CCD is van oordeel dat de aangehaalde uitspraak van toepassing is op zowel de namen van medewerkers van het secretariaat van de CCD als op namen van medewerkers van de vergunninghouders en/of de DEC's. Aangezien zowel in het bezwaarschrift als tijdens de hoorzitting op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarmaking zwaarder weegt dan het belang van het weigeren van deze informatie, ziet de CCD geen aanleiding om deze informatie (alsnog) te openbaren.

Ten aanzien van de dreiging van dierenrechtenactivisme wordt opgemerkt dat ook om deze reden de betreffende informatie geweigerd blijft. In andere bezwaarschriften (bijvoorbeeld met uw kenmerken 2016/036, 2017/003, 2017/006 en 2017/029) heeft u deze bezwaargrond aangevuld en heeft u aangegeven dat de motivering van de Afdeling in de uitspraak van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) uitsluitend wordt gebaseerd op het feit dat onweersproken zou zijn gesteld dat betrokken vergunninghouders in de afgelopen jaren te maken hebben gehad met bedreigingen en intimidatie en dat de dreiging van dierenrechtenactivisme nog actueel is, de opmerking over een mogelijke heropleving van dierenrechtenextremisme in een rapportage van de NCTV en dat dierenrechtenextremisme nog wordt genoemd in het jaarverslag van de AIVD. Daarnaast heeft u aangegeven dat de vergunninghouders geen van allen zijn geconfronteerd met ontoelaatbare acties van dierenrechtenextremisten, dat de



NCTV geen kennis heeft van recente acties van dierenrechtenextremisten en dat de AIVD kennelijk geen dreiging van dierenrechtenextremisme meer ziet.

Het bovenstaande is door u tevens aangevoerd in een hoger beroepsprocedure, welke uiteindelijk heeft geleid tot de uitspraak van de Afdeling van 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). In deze uitspraak verwijst de Afdeling naar de recente uitspraken van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), waarbij de Afdeling heeft overwogen dat de vrees voor dierenrechtenactivisme gerechtvaardigd is. De Afdeling ziet naar aanleiding van deze motivering geen aanleiding om thans tot een ander oordeel te komen. Het enkele feit dat in het jaarverslag van de AIVD over 2016 geen aparte signalering over dierenrechtenextremisme is opgenomen, is onvoldoende om thans tot een ander oordeel te komen dan in voormelde uitspraak.

Het voornoemde is nogmaals bevestigd in de zeer recente uitspraak van de Afdeling van 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282), waarbij aanvullend is aangegeven dat derde belanghebbenden geen concrete tot hen gerichte dreiging van dierenrechtenactivisme aannemelijk hoeven te maken. Ook uit de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 5 april 2018 (ECLI:NL:RBGEL:2018:1532) en van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766) volgt, dat vanwege de gerechtvaardigde vrees voor dreiging van dierenrechtenactivisme, het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Ten aanzien van bezwaar 5

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

Tenslotte heeft u in uw bezwaarschrift aangegeven dat de stelling dat bij openbaarmaking gegevens niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten geen hout snijdt. Ook het argument dat er nog patent moet worden aangevraagd, houdt volgens u geen stand. Onderzoeksstrategieën zijn naar uw mening bovendien niet patentwaardig.

Vooropgesteld zij dat de betreffende informatie (in vergunning 2016467) is geweigerd, omdat sprake is van concurrentiegevoelige informatie (zie onder bezwaar 3, waar hierop nader is ingegaan).

In veel gevallen is bescherming van de onderzoeksstrategie middels intellectueel eigendom nog niet mogelijk, nu dit onderzoek zich nog in de beginfase bevindt. De betreffende vergunning (2016467) heeft een looptijd tot en met 2021, waardoor dit onderzoek zich nog altijd in de beginfase bevindt. Het voornemen van onderzoeker om patent aan te vragen, werkt signalerend voor het belang van het onderzoek en daarmee om de te weigeren informatie geweigerd te houden.

De CCD is van oordeel dat nu het onderzoek nog grotendeels moet worden uitgevoerd, er dus nader onderzoek nodig is en er nog geen publicaties zijn geweest over het voorliggende onderzoek, het niet wenselijk is dat onder andere de strategie van de komende tijd al in deze fase wordt geopenbaard. Onderdelen worden nog getest en pas na de dierproeven worden resultaten duidelijk en dus

ook of bescherming middels intellectueel eigendomsrecht mogelijk is. Wanneer de betreffende informatie reeds nu wordt geopenbaard, is verder onderzoek niet meer van belang.

De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd en dat de vergunninghouder voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers, als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, zwaarder moet wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de hiervoor genoemde concurrentiegevoelige gegevens. De CCD verwijst hierbij naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 3 juli 2017 (ECLI:NL:RBGEL:2017:3427).

Verzoek proceskostenvergoeding

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht heeft u recht op een vergoeding van € 1.002,- zijnde 1 punt á € 501,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 501,- voor de gehouden hoorzitting.

Wijze van openbaarmaking

Aangezien de mogelijkheid bestaat dat belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan vier weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

Beroep

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijst ik u naar www.rechtspraak.nl.

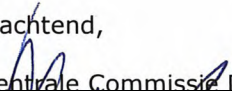
U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor dient u wel te beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

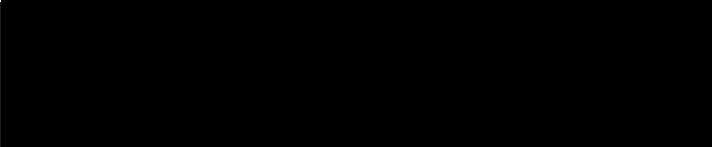


Tot slot

In deze brief is u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl of neem telefonisch contact met ons op via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,


De Centrale Commissie Dierproeven



dr. L. Hellebrekers
Voorzitter

| Inventaris Wob-verzoek W16-16S | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
| | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
| | NTS2016467 | | | | | | | | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | |
| 2 | Projectvoorstel oud | | | | x | | x | x | |
| 3 | Niet-technische samenvatting oud | | | x | | | | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud | | | | x | | x | x | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud | | | | x | | x | x | |
| 6 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud | | | | x | | x | x | |
| 7 | DEC-advies | | | | x | | | x | |
| 8 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | |
| 9 | Verzoek aanvulling aanvraag | | | | x | | x | x | |
| 10 | Projectvoorstel herzien | | | | x | | x | x | |
| 11 | Niet-technische samenvatting herzien | x | | | | | | | |
| 12 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien | | | | x | | x | x | |
| 13 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien | | | | x | | x | x | |
| 14 | Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien | | | | x | | x | x | |
| 15 | Advies CCD | | x | | | | | | x |
| 16 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | |



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl 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 | 10800 |
| | | <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 | Universiteit Utrecht |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 30275924 |
| 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 | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht |
| | | Postbus | 12007 |
| | | Postcode en plaats | 3501AA Utrecht |
| | | IBAN | NL27INGB0000425267 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 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 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> 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 *wijziging* 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 type="checkbox"/> Nee > Ga verder met vraag 3 |
- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?
- | |
|--|
| <input 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 | 1 - 5 - 2016 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441,- 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
-

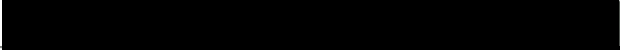
6 Ondertekening


- 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 *Utrecht*

Datum *14-03-2016*

Handtekening 

Handwritten text, possibly a signature or date, located in the lower-left quadrant of the page.



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.
- 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.

In de westerse wereld is er toename aan patiënten met **chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten** (zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis en dermatitis). Alleen reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van

alle volwassenen. Het probleem in deze chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is de foutieve immuun regulatie in deze patiënten, die zorgt voor het ontwikkelen van een auto-immune ontsteking gericht tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie in deze patiënten is gebaseerd op algehele aspecifieke immuun suppressie. Het levenslange gebruik van deze medicatie gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie, en is helaas niet effectief in alle patiënten.

De ideale therapie in dergelijke chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is het herstellen van de immuun balans door het herstellen van tolerantie specifiek tegen de lichaamseigen antigenen. Helaas blijkt het induceren van tolerantie *tijdens* chronische ontstekingen lastig.

Regulerende T_H17 cellen zijn cruciaal in de immuun balans. In veel chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is beschreven dat de regulerende T_H17 cellen verminderd aanwezig zijn of verminderd functioneel zijn. Door het activeren of induceren van regulerende T_H17 cellen gericht tegen het ziekte inducerend-antigeen kan de immuun balans hersteld worden¹. T_H17 cellen zijn hierbij van groot belang. DCs spelen een centrale rol in het immuunsysteem en zijn essentieel voor de inductie van een effectieve T_H17 cel response tegen pathogenen maar ook voor het induceren van T_H17 cellen in de periferie en hierdoor dragen ze bij aan het behoud van de immuun balans².

Het exploiteren van T_H17 cellen als target voor immuuntherapie kan op verschillende manieren. Ten eerste kan je T_H17 cellen die zogeheten tolerogene eigenschappen hebben gebruiken als celtherapie. Initiële studies laten zien dat met behulp van deze T_H17 cellen (T_H17) ziekte kan worden voorkomen in diermodellen voor chronische ontstekingen^{3,4,5}. Daarnaast heeft een initiële fase I trials in New Castle in de mens laten zien dat het geven van T_H17 therapie in principe veilig is in arthritis patiënten. Zij hebben geen bijwerkingen gezien tijdens de trial maar de effectiviteit kon niet beoordeeld worden in deze trials (persoonlijke communicatie).

Het probleem is dat het onduidelijk is wat de effectiviteit van een dergelijke T_H17 therapie tijdens chronische ontstekingen bepaald en aan welke criteria, op zowel moleculair als eiwit niveau, de T_H17 moet voldoen om in een patiënt met een chronische (auto-immuun) ziekte effectief en veilig te zijn. Een tweede manier om T_H17 cellen te gebruiken als mogelijk therapeutische route is door het ontwikkelen van een T_H17 vaccin. Wat we hiermee bedoelen is een vaccinatie die zorgt dat er regulerende T_H17 cellen geïnduceerd worden in vivo tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een tolerogeen adjuvans of het gericht vaccineren via tolerogene routes. Vele studies hebben laten zien dat profylactisch vaccineren via mucosale routes met zelf-antigenen ziekte inductie kan voorkomen. Het therapeutisch vaccineren tijdens ziekte is echter veel minder effectief. De hypothese is dat de in vivo aanwezige T_H17 tijdens een chronische ontsteking veranderd zijn, maar ook hier zijn de exacte eigenschappen van de dendritische cellen onbekend.

Voor dat een effectieve immuuntherapie met behulp van T_H17 s in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten ontwikkeld kan worden is het dus cruciaal dat de eigenschappen van T_H17 goed in kaart worden gebracht en dat de effectiviteit van verschillende directe en indirecte therapieën vergeleken worden **tijdens** chronische ontsteking.

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?

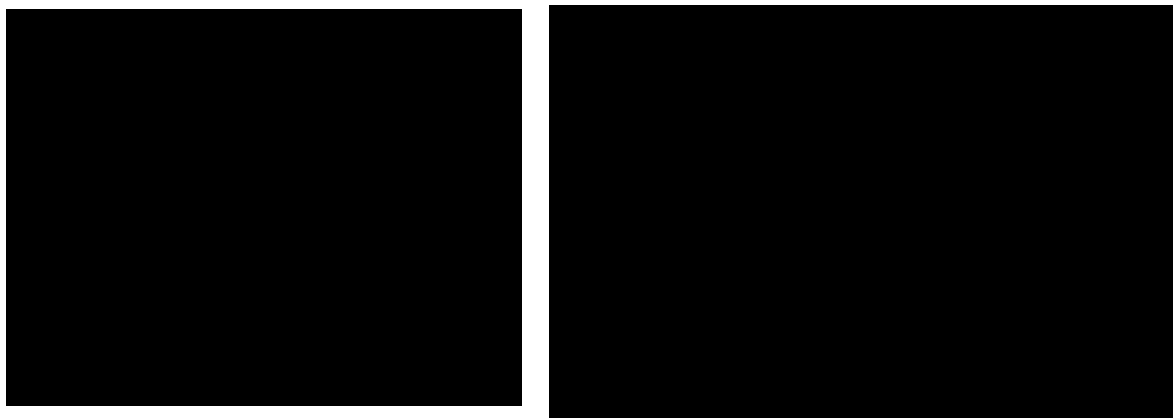
1. Wat zijn de karakteristieken van en in vitro gekweekte T_H17 die effectief regulerende T_H17 cellen induceert tijdens chronische ontsteking.
Het beantwoorden van deze vraag zal een grote stap voorwaarts opleveren voor het ontwikkelen van T_H17 therapie. Voor het veilig en effectief ontwikkelen van T_H17 therapie is het essentieel

om te weten welke factoren een [redacted] definiëren op eiwit niveau en moleculair niveau en op het niveau van cel-cel interactie. Momenteel is het niet bekend welke eigenschappen van de [redacted] cruciaal zijn om [redacted] te induceren tijdens chronische ontstekingen. Ook is onbekend welke factoren bepalen dat een [redacted] niet verandert van functie na inspuiten bij een chronische ontsteking. Dit laatste is natuurlijk cruciaal voor veilige therapie, want als een [redacted] kan veranderen kan de effectiviteit van de therapie verminderen of in het ergste geval zelfs de ziekte verergeren⁴. Andere vragen die beantwoord moeten worden voordat een effectieve [redacted] celtherapie in de mens kan worden toegepast tijdens ziekte, is wat de ideale omstandigheden zijn voor therapie zoals, route van toediening, frequentie van behandeling, dosis van behandeling, antigeen belading van de [redacted] en welk kweek protocol het meest effectief is.

2. Kunnen we tijdens chronische ontsteking een [redacted] vaccin inzetten om in vivo via [redacted] regulerende [redacted] cellen te induceren en zo de immuun balans te herstellen. In dit deel van het onderzoek zal gekeken worden of het mogelijk is een therapeutisch vaccin te ontwikkelen waarmee in vivo [redacted] getarget kunnen worden en aan welke voorwaarden een dergelijk vaccin moet voldoen. Dit zal gedaan worden op basis van het maken van verschillende combinaties eiwit adjuvans en/of verschillende routes van toediening van het therapeutisch vaccin. Daarnaast zal ook gekeken worden naar het [redacted] dat tijdens de vaccinatie bereikt wordt in vivo en welke [redacted] essentieel zijn voor een [redacted] vaccinatie.

Haalbaarheid:

In dit project willen we een aantal fundamentele vragen beantwoorden die nodig zijn voor het ontwikkelen van [redacted] therapie in de toekomst. Binnen de onderzoeksgroep hebben we al aangetoond met behulp van in vitro onderzoek dat een bepaald type in vitro gekweekte [redacted] ([redacted]), maar of deze cellen ook in vivo effectief zijn is onbekend.



Figuur 1: [redacted] zijn gekweekt vanuit beenmerg van muizen in aanwezigheid van [redacted] en [redacted]. Deze [redacted] hebben [redacted]. Deze [redacted] zorgen voor activatie van [redacted] cellen. Daarnaast bleken [redacted] cellen gestimuleerd met deze [redacted].

In het verleden hebben we meer onderzoek gedaan naar [redacted] therapie in artritis binnen onze onderzoeksgroep. Uit dit onderzoek is gebleken dat [redacted] artritis kunnen onderdrukken wanneer profylactisch toegediend, helaas bleken deze [redacted] niet in staat chronische (auto-immuun) ziekte te onderdrukken. In de literatuur zijn momenteel meerdere [redacted] kweek protocollen beschreven die mogelijk wel een chronische ontsteking kunnen onderdrukken en juist deze zouden we in detail willen bestuderen in dit project^{3,7}. Door het vergelijken van verschillende [redacted] protocollen en analyseren van de effectiviteit van verschillende [redacted] subsets in het induceren van regulerende [redacted] cellen tijdens chronische ontsteking, zowel in vitro als in vivo, kunnen we in dit project duidelijk aantonen welke [redacted] kunnen induceren tijdens chronische ontsteking. Door het vergelijken van

de moleculaire en eiwit profielen van deze cellen kunnen we zeer gedetailleerd in kaart brengen aan welke eigenschappen een effectieve [REDACTED] moet voldoen. Deze kennis kan gebruikt worden om een biomarker te ontwikkelen voor het testen van [REDACTED] voor humane therapeutische toepassing. In humane geneeskunde is het belangrijk om, voordat de therapie wordt toegepast, te weten of de celtherapie effectief en veilig is iedere keer dat een individuele patiënt behandeld wordt.

Daarnaast is binnen de onderzoeksgroep de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van mogelijke [REDACTED] vaccinaties. [REDACTED] hierbij onder andere gekeken naar mucosale toediening van zelf eiwitten ter voorkoming van ziekte⁸, of specifiek gericht targeten van [REDACTED]⁹. Via beide routes werd het ontstaan van artritis verminderd door het induceren van [REDACTED]. Helaas bleken beide methoden minder effectief als therapie dan profylactisch. Wat de oorzaak is van deze verminderde effectiviteit willen we graag uitzoeken door de [REDACTED] goed in kaart te brengen.

Een laatste punt waar we binnen de onderzoeksgroep naar gekeken hebben is of er mogelijk [REDACTED] adjuvantia beschikbaar zijn. Eerste aanwijzingen naar het gebruik van PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) partikels wees uit dat deze gebruikt kunnen worden om tolerantie inducerende capaciteit van een vaccin te verhogen¹⁰, door het moduleren van [REDACTED]. [REDACTED] die behandeld werden met PLGA partikels brachten meer retinaldehyde dehydrogenase tot expressie, wat mogelijk een rol speelt in het induceren van regulerende [REDACTED] cellen¹¹.

Deze [REDACTED] studies die aansluiten bij de huidige aanvraag geven aan dat binnen de [REDACTED] de ervaring aanwezig is die noodzakelijk is voor het succesvol uitvoeren van het project.

Naast het gebruik van technieken en vaardigheden die beschikbaar zijn binnen de onderzoeksgroep zullen we gebruik maken van uitgebreide samenwerkingen nationaal en internationaal. Binnen het onderzoek naar [REDACTED] therapie is er vanuit de EU een werkgroep opgericht die AFFACT heet. In deze werkgroep wordt 2 maal per jaar overlegd over het onderzoek naar [REDACTED] en de problemen en oplossingen die men heeft gevonden. Als actieve deelnemers aan deze werkgroep zijn we snel op de hoogte van de nieuwste ontwikkelingen en kunnen hier actief op inspringen.

Voor het ontwikkelen van een [REDACTED] model zoals verderop beschreven in [REDACTED] zullen we gebruik maken van de expertise van de groep uit Nijmegen die dit model heeft opgezet en daar eerst de techniek en het model leren voordat we dit zelf zullen toepassen.

3.3 Belang

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

Het wetenschappelijk belang van deze studie is dat momenteel niet bekend is aan welke parameters een [REDACTED] moet voldoen om veilig en effectieve therapie te effectueren tijdens een chronische ontsteking. Ook is momenteel niet bekend of het mogelijk is een [REDACTED] vaccin in te zetten als therapie tijdens chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten. Deze kennis is van groot belang om deze therapie in de toekomst mogelijk te maken. De ontwikkeling van een mogelijke biomarker die vooraf effectiviteit en veiligheid van de celtherapie kan voorspellen bij de individuele patiënt is van groot belang om deze vorm van therapie in de toekomst mogelijk te maken. Het maatschappelijk belang zit in het induceren van langdurige tolerantie in de groter wordende groep mensen met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten, zoals patiënten met reumatoïde artritis, dermatitis, diabetes, colitis of MS. De kennis vanuit deze studie kan bijdragen aan de toekomstige ontwikkeling van een langdurig herstel van de immuun balans in vele patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten op de lange termijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

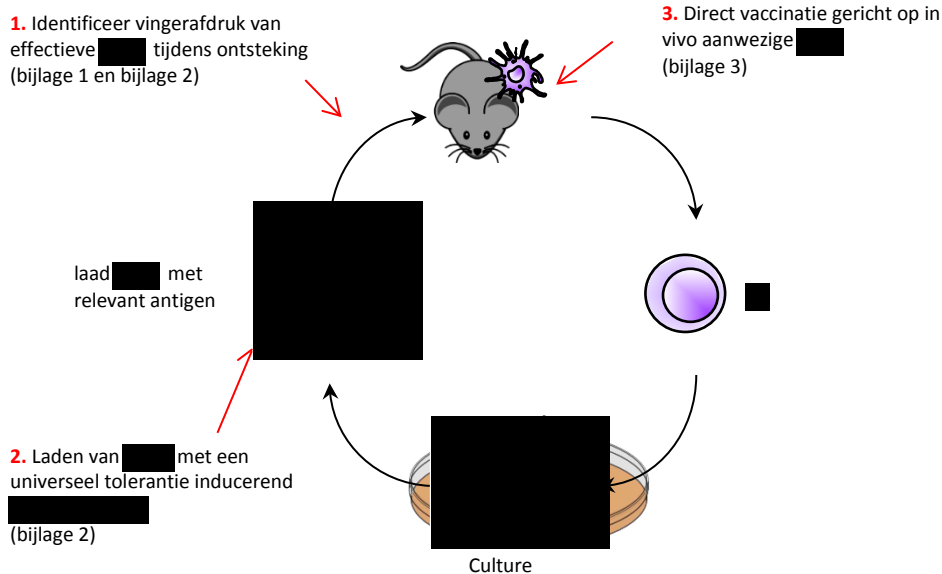
Binnen de studie willen we kijken of we een therapie kunnen ontwikkelen die een chronisch (auto-immuun) ontstekingsmodel zoals artritis kan onderdrukken.

In het eerste deel (bijlage 1) van het onderzoek willen we verschillende in vitro kweek protocollen voor het kweken van mogelijke [REDACTED] met elkaar vergelijken. In de literatuur zijn verschillende [REDACTED] protocollen beschreven^{3,7}. Het betreft vaak een gemengde cel populatie waarin ook [REDACTED] aanwezig zijn¹³. Hoewel het voor het onderzoek belangrijker is dat de cellen [REDACTED] zijn dan welk subtype [REDACTED] exact aanwezig is, zal dit wel meegenomen worden in de karakterisatie van de cellen. Door de protocollen met elkaar in vitro te vergelijken kunnen we de meest veelbelovende selecteren voor verder in vivo onderzoek. [REDACTED] zullen in vitro gekweekt worden en hun oppervlakte markers zullen gekarakteriseerd worden met behulp van flowcytometrie analyse. Tevens zullen we eiwit productie en [REDACTED] analyseren. Deze eiwitten [REDACTED] zijn van groot belang voor inter-cel communicatie en geven informatie over het functioneren van de [REDACTED]. Door het gebruik van qPCR, mRNA analyse en het gebruik van microarrays zullen we tevens de moleculaire vingerafdruk van deze cellen in kaart brengen. Juist deze laatste gedetailleerde analyse zal informatie geven welke unieke eigenschappen een [REDACTED] heeft. Naast het in kaart brengen van het fenotype van de gekweekte [REDACTED] willen we ook analyseren of de [REDACTED] in vitro regulerende [REDACTED] cellen kan induceren. Hiertoe zullen naïeve antigeen specifieke [REDACTED] cellen (geïsoleerd uit een [REDACTED] muis) gekweekt worden in aanwezigheid van [REDACTED] en antigeen. Na afloop zullen we de [REDACTED] cellen analyseren op expressie van markers die specifiek zijn voor [REDACTED] cellen, zoals [REDACTED] en hun [REDACTED] activiteit meten in een in vitro [REDACTED] assay.

In het verlengde (bijlage 2) hiervan willen we de twee typen [REDACTED] die in bijlage 1 getest zijn en daar effectief bleken om [REDACTED] cellen te induceren gebruiken, als celtherapie in vivo in chronische ontsteking. Door de [REDACTED] geladen met een [REDACTED] antigeen in te spuiten in diermodellen voor chronische ontstekingen zoals artritis, dermatitis en transplantatie, kan het ziekteverloop worden bestudeerd. Met behulp van [REDACTED] muizen kunnen we ook de [REDACTED] in vivo in detail volgen. Hiertoe worden [REDACTED] cellen geïsoleerd uit [REDACTED] muizen, gelabeld met een vitale fluorescente kleurstof en ingespoten in dieren met artritis. Deze cellen kunnen we aan het eind van de studie isoleren uit de immuun organen en bestuderen of ze [REDACTED] eigenschappen hebben gekregen.

In dit deel zullen we ook de effectiviteit van toIDCs geladen met het [REDACTED] inducerend [REDACTED] ([REDACTED]) vergelijken met [REDACTED] geladen met [REDACTED] eiwitten. Eerdere studies hebben laten zien dat [REDACTED] eiwitten verschillende chronische ontstekingen kunnen remmen en mogelijk als therapie ingezet zouden kunnen worden om [REDACTED] te induceren tegen chronische ontstekingen¹². Om dit te bevestigen zullen we de met [REDACTED] inspuiten in andere modellen voor chronische ontsteking zoals dermatitis in de muis. Om een translationele stap te zetten naar de mens willen we ook gebruik maken van een [REDACTED] model voor transplantatie. In dit model worden [REDACTED] immuun cellen in een muis gespoten na een transplantatie en [REDACTED], de immuunreactie (afstotingsreactie) die hierdoor ontstaat is te onderdrukken met [REDACTED] cellen. Dit model is opgezet in Nijmegen¹⁵ en zal ook in nauwe samenwerking worden uitgevoerd. Dit model zal uitwijzen of [REDACTED] eiwit ook humaan effectief zijn in een gecompliceerde in vivo immuunreactie, deze stap is cruciaal voor toekomstige toepassing in humane geneeskunde.

Het laatste deel van de studie (bijlage 3) zal zich meer richten op het induceren van [REDACTED] cellen door direct te vaccineren met een [REDACTED] vaccin. Hiervoor willen we verschillende adjuvantia¹⁴ (bijvoorbeeld gemodificeerde [REDACTED] liganden, nanoparticles, nanoparticles met immuun [REDACTED] eiwitten¹² of [REDACTED]⁸ in het geval van chronische ontstekingen of artritis specifiek) en dieren behandelen tijdens de ziekte. Het voordeel van deze aanpak is dat een directe vaccinatie therapie niet afhankelijk is van celkweek in gespecialiseerde ziekenhuizen en dus breder ingezet kan worden en

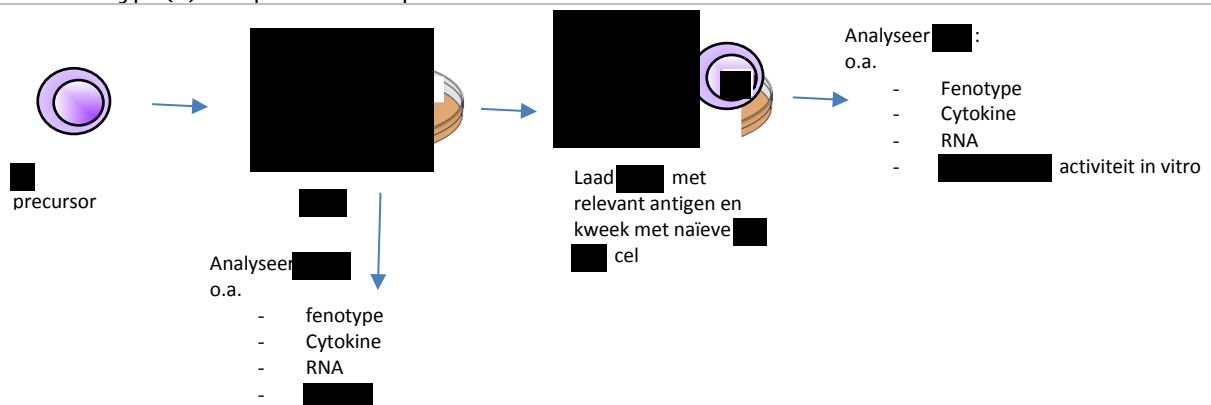


mogelijk meer patiënten kan bereiken. Met de kennis verkregen uit de andere twee delen kan gericht gekeken worden welke [redacted] cellen getarget moeten worden met een vaccin.

Figuur 2:

Schematische weergave van [redacted] kweek en therapie en de interactie tussen de verschillende bijlagen. [redacted] voorloper cellen worden geïsoleerd, in vitro gekweekt tot [redacted], geladen met antigenen. Na analyse in bijlage 1 worden de cellen ingespoten in muizen met een chronische ontsteking in bijlage 2. In bijlage 3 wordt de mogelijkheid van celvrije therapie onderzocht door direct [redacted] in vivo te bereiken met behulp van een [redacted] vaccin.

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



Deel 1: In dit deel zullen we beenmerg en andere lymfoïde organen uit naïeve muizen gebruiken als donor cellen voor het kweken van [redacted] in vitro. Het fenotype van de [redacted] zal beoordeeld worden met behulp van verschillende analyses zoals fluorescence activated cell sorting (FACS), microarray, luminex (voor eiwit en RNA productie), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en [redacted]. De in vitro functionaliteit zal beoordeeld worden met behulp van [redacted] cellen uit native donor muizen. Door [redacted] te laden met een antigenen en [redacted] te stimuleren kan beoordeeld worden wat voor [redacted] cel reactie [redacted] in vitro induceren.

Figuur 3: schematische weergave van de kweek en de analyse van [redacted] in bijlage 1.

[redacted] precursors uit beenmerg worden gekweekt tot [redacted] in vitro, vervolgens worden deze direct geanalyseerd op uiterlijke kenmerken en vervolgens functioneel geanalyseerd door te kijken of ze

█ cells kunnen induceren. Dit wordt geanalyseerd door de █ cells te bestuderen op fenotype, cytokine productie en ook █ capaciteit in een █ assay.

Deel 2: In het tweede deel zal bekeken worden of █ zoals gekweekt in het eerste deel, functioneel zijn in vivo tijdens chronische ontstekingsreacties. Hier worden maximaal twee kweekmethoden gekozen, op basis van de effectiviteit van de █ om in vitro █ cells te induceren. In eerst instantie zullen we dit in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model testen. In dit model voor chronische artritis in de muis wordt een immuunreactie tegen het kraakbeen opgewekt door inspuiten van het kraakbeeneiwit proteoglycaan en met dit model hebben we veel ervaring binnen de vakgroep^{o.a. 6,8,9,12}. Verder hebben we de beschikking over █ muizen met een specificiteit voor het ziekte inducerend proteoglycaan. █

█¹². Hier zullen we verschillende routes van toediening (intradermaal, s.c., i.v. etc.), timing, frequenties (enkelvoudig of meervoudig) en de verschillende antigenen (bijvoorbeeld proteoglycaan en heat shock eiwit) met elkaar vergelijken en uitlezen op effectiviteit om de ontsteking te onderdrukken. Hierbij willen we ook het mechanisme van de therapeutische effectiviteit in kaart brengen met behulp van █ cel transfers naar de dieren met artritis en kijken of er inderdaad █ cells geïnduceerd worden en mogelijk de ziekte wordt geremd door deze cells. Door de verschillende transgene █ cells met congene markers te gebruiken en voor het transfereren te labelen met verschillende vitale fluorescente labels kunnen we deze in vivo vervolgen en aan het einde van het experiment in vitro verder analyseren. De protocollen die het meest effectief blijken willen we vervolgen ook testen in andere modellen voor chronische ontsteking zoals bijvoorbeeld humane transplantatie¹⁵ en atopische dermatitis¹⁶. Voor het █ model is gekozen omdat dit een █ muis model is waarin de humane afweerreactie en █ inductie bestudeerd kan worden. Dit model zal in nauwe samenwerking met een onderzoeksgroep in █ worden uitgevoerd, omdat deze groep ervaring heeft met dit model. Het dermatitis model is gekozen omdat dit een chronisch ontstekingsmodel is waarmee ervaring is binnen de vakgroep en omdat dit model een ander type ontsteking geeft dan artritis. Artritis is een meer Th1 type ontsteking, terwijl dermatitis een meer gemengd Th2, Th1 beeld geeft. Door juist verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of █ therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. In het geval van onderzoek bij dermatitis zal het █) vergeleken worden met █

Deel 3: In het laatste deel willen we een █ vaccin testen. Het is bekend dat via bepaalde routes █ in vivo getarget kunnen worden. Bijvoorbeeld via █ of █ vaccinatie routes. Het is echter moeilijk om tijdens chronische ontsteking deze █ te bereiken. Om dit te verbeteren willen we een vaccin combineren met een ziekte relevant antigen █ en een mogelijk █ adjuvans. De keuze voor de █ adjuvantia zal gemaakt worden op basis van literatuur en eerdere resultaten vanuit de onderzoeksgroep. Een voorbeeld is nanoparticles (█, deze induceren een █ fenotype in █^{10,11}. Door █ partikel te combineren met █ peptide via een tolerogene route is het mogelijk een tolerogeen vaccin te maken. Naast PLGA willen we ook █ TLR liganden █ en andere nanopartikels al dan niet geladen met anti-inflammatoire hulpstoffen (denk hierbij aan antilichamen of siRNA tegen █) of nieuwe tolerogene adjuvantia testen. Ook in dit deel van de studie zullen we het mechanisme van het vaccin en de effectiviteit van regulerende █ inductie monitoren met behulp van de verschillende █ receptor transgene muismodellen. Tevens zal met behulp van verschillend conditionele knock-out muizen waarin specifieke subsets █ kunnen worden uitgeschakeld gekeken worden welke █ in vivo essentieel is voor het bereiken van een █ effect. Wanneer het █ effectief is als █ vaccin willen we dit herhalen in andere chronische ontstekingsmiddelen zoals, transplantatie en atopische dermatitis. Dit zijn ook modellen waar in de █ een belangrijke rol speelt tijdens de ontstekingen¹⁷.

Referentielijst DEC aanvraag [REDACTED]

Referenties:

1. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562
2. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., & Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 549-559.
3. Hilkens, C. M., Isaacs, J. D., & Thomson, A. W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*, 29(2), 156-183.
4. Hilkens, C. M. U., & Isaacs, J. D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now?. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 148-157.
5. Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3656-3665.
6. [REDACTED]
7. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*, 241(1), 206-227.
8. [REDACTED]
9. [REDACTED]
10. [REDACTED]
11. [REDACTED]
12. [REDACTED]
13. Helft, Julie, et al. "GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c+ MHCII+ macrophages and dendritic cells." *Immunity* 42.6 (2015): 1197-1211.
14. Keijzer, Chantal, et al. "Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases." *Frontiers in immunology* 4 (2013).
15. [REDACTED]
16. Spergel, Jonathan M., et al. "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *Journal of Clinical Investigation* 103.8 (1999): 1103.
17. Van Eden, Willem, Ruurd Van der Zee, and Berent Prakken. "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." *Nature Reviews Immunology* 5.4 (2005): 318-330.
18. Glant, Tibor T., Alison Finnegan, and Katalin Mikecz. "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics." *Critical Reviews™ in Immunology* 23.3 (2003).
19. Hawkins, Penny, et al. "Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research." *Inflammopharmacology* 23.4 (2015): 131-150.
20. Hish Jr, Gerald A., et al. "Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 53.5 (2014): 485.

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.

Deel 1: De data uit deel 1 zullen gebruiken om de [REDACTED] kweek methoden voor deel 2 te optimaliseren.

Deel 2: slechts twee van de [REDACTED] protocollen die in deel 1 het meest effectief [REDACTED] cellen [REDACTED] zullen ook daadwerkelijk in vivo getest worden op therapeutische effectiviteit. De meest [REDACTED] zal vervolgens in deel 1 in nog meer detail bekeken worden met behulp van microarray analyse

Deel 3: De kennis van de eigenschappen van [REDACTED] uit 1 en 2 zal bijdragen aan mogelijkheid om in vivo [REDACTED] te karakteriseren, daarnaast zullen de kritische eigenschappen voor een [REDACTED] helpen in de zoektocht naar een effectief toleroegen vaccin.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | In vitro kweek van ██████████ en analyse van fenotype en functie |
| 2 | █████████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| 3 | Ontwikkelen van een ██████████ vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

| | |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project | Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten |
| 1.2 Looptijd van het project | 1-2-2016 t/m 1-2-2021 |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Chronische auto-immuunziekten, therapie, vaccin, cel therapie |

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

| | |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Chronische ontstekingsziekten, zoals reuma, diabetes en colitis, zijn een zware belasting voor patiënten. Dit soort chronische ontstekingen zijn het gevolg van een fout in het immuunsysteem waardoor de balans verstoord is. Het immuunsysteem reageert dan op lichaamseigen eiwitten. De huidige medicatie is gericht op het geheel onderdrukken van het immuunsysteem. Langdurig gebruik gaat gepaard met bijwerkingen, zoals meer infecties en tumoren. Bovendien komt het voor dat de therapie na verloop van tijd minder goed of helemaal niet meer werkt. Beter zou zijn om de balans in het immuunsysteem te herstellen.</p> <p>Ons onderzoek is gericht op het vinden van een nieuwe therapie die de</p> |
|---|---|

immuunbalans kan herstellen bij patiënten met een chronische ziekte. Dit is helaas een steeds groter wordende groep patiënten in de westerse wereld, alleen al reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van de gehele bevolking. Een therapie die de immuunbalans kan herstellen is dus van grote maatschappelijke waarde.

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

In het eerste deel van het onderzoek kijken we of het mogelijk is de balans in het immuunsysteem te herstellen via een zogeheten celtherapie. Hiervoor maken we in het laboratorium een bepaalde witte bloedcel na die belangrijk is voor het in stand houden van de immuunbalans bij gezonde mensen en dieren. Tijdens ziekte geven we de cel terug aan het zieke dier en kijken we of we daarmee de balans herstellen. Ook willen we een antwoord krijgen op de vraag aan welke voorwaarden een goede, effectieve en veilige celtherapie moet voldoen. Deze voorwaarden kunnen in de toekomst gebruikt worden om cellen te testen voordat ze in de patiënt gebruikt worden.

Het tweede deel van het onderzoek geeft antwoord op de vraag of het mogelijk is een vaccin te ontwikkelen voor chronische ontstekingsziekte. Het voordeel van een vaccin is dat we er geen cellen voor hoeven te kweken, waardoor we in de toekomst meer patiënten kunnen behandelen. Een nadeel is dat vaccins juist tijdens chronische ontstekingen moeilijk inzetbaar zijn, zo blijkt uit eerder onderzoek. In dit project zullen we de vraag onderzoeken waarom het zo moeilijk is een chronische ontsteking te doorbreken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In totaal zullen we voor de verschillende delen van het onderzoek maximaal 8569 muizen gebruiken.

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

De dieren waar we de nieuwe therapie op testen zullen een chronische ziekte ontwikkelen zoals bijvoorbeeld artritis. Het geven van injecties geeft kort ongemak. Daarna ontwikkelen de dieren ziekteverschijnselen. Het onderzoeken en behandelen brengt stress voor de muizen met zich mee.

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

Ongeveer 30% van de dieren zal zonder voorafgaande handelingen worden gedood en dat geldt als licht ongerief. De dieren met chronische ziekten zullen maximaal matig ongerief ervaren.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren die celdonor zijn voor het onderzoek naar de celtherapie zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood zodat we de cellen van het immuunsysteem kunnen onderzoeken. Aan het eind van het onderzoek zullen alle andere dieren worden gedood om ze te kunnen onderzoeken.

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Het onderzoek naar een complex orgaansysteem als het immuunsysteem is helaas niet mogelijk met behulp van celkweeksystemen alleen, of door middel van computermodellen, omdat we nog niet voldoende kennis bezitten over de ingewikkelde interactie tussen de cellen.

4.2 **Vermindering**

Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.

We maken gebruik van gedegen statische berekeningen vooraf en van ziektemodellen waarmee we veel ervaring hebben, zodat we minder dieren nodig hebben om betrouwbare resultaten te verkrijgen. We maken gebruik van de expertise van de onderzoekers binnen de afdeling en werken samen met andere groepen met ervaring. Dit zorgt voor betrouwbaardere resultaten en vermindering van experimenten die om technische redenen minder succesvol zijn.

Daarnaast zullen we voor de ontwikkeling van de celtherapie eerst in het laboratorium kijken welke cellen het meest veelbelovend lijken en daar slechts enkele van testen in muizen.

4.3 **Verfijning**

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

In dit onderzoek hebben we gekozen voor muizen. Hiermee hebben we veel ervaring en door het gebruik van verschillende soorten muizen kunnen we meer informatie uit het onderzoek halen dan met het gebruik van andere diersoorten.

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

Tijdens de chronische ziekte zal de huisvesting van de dieren worden aangepast. In het geval van artritis bijvoorbeeld door de bedding in de kooi te verhogen en voer en water laag aan te bieden om belasting van de pootjes zo klein mogelijk te maken. Tevens zullen dieren regelmatig worden gecontroleerd op mate van ziekte en dieren die te veel last hebben van de ziekte volgens vooraf opgestelde normen zullen uit het experiment worden gehaald.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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

1 Algemene gegevens

| | | | |
|-----|---|----------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10800 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 1 | In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In auto-immuun ziekten valt het immuunsysteem cellen van het lichaam zelf aan. De belangrijkste reden voor dit probleem is dat de regulatie van het immuunsysteem niet goed meer werkt. Om deze regulatie weer op orde te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED] cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de regulatie en [REDACTED]. Eén van de mechanismen die de [REDACTED] kunnen gebruiken is het induceren van antigeen specifieke [REDACTED] cellen [REDACTED]). Op deze manier kunnen specifieke immuun responsen worden onderdrukt.

In het eerste deel zullen we verschillende in vitro kweek methoden om [REDACTED] te kweken met elkaar vergelijken. Hiertoe worden [REDACTED] precursors geïsoleerd uit naïeve muizen die worden gedood zonder voorafgaande handelingen en vervolgens worden de cellen gekweekt in vitro. De effectiviteit van de [REDACTED] in vitro zal uitgelezen worden met behulp van FACS, PCR en luminex, waarbij expressie van oppervlakte markers, productie van cytokines of [REDACTED] en gebruik van verschillende transcriptie factoren wordt beoordeeld. Daarnaast zal ook worden bestudeerd hoe effectief de [REDACTED] zijn in het induceren van [REDACTED] cellen. Dit zal worden getest via een co-culture van de [REDACTED] met [REDACTED] cel receptor transgene [REDACTED] cellen welke een bekende specificiteit hebben, zoals weergegeven in figuur [REDACTED] van de projectaanvraag. [REDACTED] cellen met een transgene [REDACTED] cel receptor worden geïsoleerd uit naïeve muizen specifiek voor de [REDACTED] cel receptor die gedood worden zonder voorafgaande handelingen. Daarnaast is er momenteel geen helder raamwerk bekend waaraan een veilige effectieve [REDACTED] moet voldoen, de zogeheten [REDACTED] vingerafdruk. Deze vingerafdruk zullen we in kaart brengen van de 2 meest effectieve kweek methoden, die het best [REDACTED] cellen induceren in vitro en tevens effectief zijn in vivo (getest in bijlage 2). Het in kaart brengen zal gebeuren door een uitgebreide analyse uit te

voeren met behulp van microarrays en RNA sequencing. Deze vraagstukken zullen beantwoord worden door middel van de experimenten zoals beschreven in deze bijlage.

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

Alle dieren in dit deel van de projectaanvraag zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood en vervolgens zullen de lymfoïde organen gebruikt worden voor het isoleren van [REDACTED] voorloper cellen en [REDACTED] cellen.

Alle analyses zullen in vitro worden uitgevoerd.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De parameters zijn per primaire uitkomst parameter voor de power analyse zijn toegelicht hieronder.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten zal als diersoort de muis (tussen 6-12 weken oud) gebruikt worden. In eerdere experimenten is gebleken dat het kweken van [REDACTED] van muizen van deze leeftijd het meest succesvol is en de hoogste opbrengst gegenereerd. Als donor muizen voor de [REDACTED] wordt gebruik gemaakt veel gebruikte muizen stammen zoals Balb/c, C57BL of F1 van beide stammen. Deze dieren worden aangekocht van erkende proefdierleveranciers. Deze stammen worden gebruikt omdat op deze manier de data vergelijkbaar zijn met data uit de literatuur en omdat deze stammen ook gevoelig zijn voor de ontstekingsmodellen beschreven in bijlage 2. Zo wordt het proteoglycaan arthritis model geïnduceerd in Balb/c en beide stammen zijn gevoelig voor dermatitis, maar met een hogere incidentie in C57BL model. De [REDACTED] receptor transgene muizen die hieronder besproken worden zijn afkomstig uit eigen fok. De muizen zijn transgeen voor een [REDACTED] cel receptor specifiek voor bijvoorbeeld proteoglycaan, [REDACTED] eiwit of ovalbumine, de [REDACTED] eiwitten voor de modellen die in bijlage 2 getest zullen worden.

Om [REDACTED] te kweken zijn [REDACTED] donoren nodig aangezien de [REDACTED] worden gekweekt.

In het project willen we maximaal 10 verschillende (reeds in de literatuur beschreven) [REDACTED] protocollen vergelijken³. Verschillende kweekmethoden geven verschillende type cellen, en van enkele in het verleden beschreven [REDACTED] kweekprotocollen is bekend dat deze profylactisch [REDACTED] zijn, maar niet functioneel [REDACTED] kunnen induceren tijdens ontsteking⁶. Juist dit laatste is cruciaal om effectief als [REDACTED] therapie ingezet te kunnen worden bij patiënten. Door meerdere protocollen en de verschillende cellen die tijdens de kweek ontstaan gedetailleerd te onderzoeken in vitro onder artificiële ontstekingscondities (toevoeging van o.a. ontstekingsmediatoren aan het kweekmedium) voor we deze in vivo testen willen we het aantal gebruikte dieren zoveel mogelijk beperken en alleen de meest veelbelovende cellen in vivo testen.

In het verleden is gebleken dat we voor het opzetten van een nieuwe kweek methode ongeveer 5 muizen nodig hebben als [REDACTED] donor ($5 \times 10 = 50$ muizen). Dit aantal is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia om de meest optimale cel aantallen na afloop van de kweek te verkrijgen, juist het kweken in aanwezigheid van [REDACTED] condities zorgt voor verminderde celopbrengsten (persoonlijke observatie). Naast het optimaliseren van de kweek condities is ook aantal cellen dat na afloop van de kweek beschikbaar is belangrijk voor analyse van oppervlakte markers, deze oppervlakte markers (bijvoorbeeld [REDACTED]) geven inzicht of de kweek daadwerkelijk [REDACTED] cellen heeft voortgebracht¹³.

Om voldoende [REDACTED] te kweken voor de analyse van de oppervlakte markers met behulp van FACS, cytokine productie en RNA met qPCR of [REDACTED] hebben we 5 donor dieren nodig. Dit is op basis van cel opbrengsten zoals we die in het verleden bepaald hebben binnen onze vakgroep na het kweken van [REDACTED] in aanwezigheid van [REDACTED]. Het mogelijk is dat niet alle kweekmethoden een zelfde hoeveelheid cellen zullen opleveren maar dit is vooraf niet met zekerheid vast te stellen.

Door ervaring uit eerdere experimenten met dergelijke parameters als cytokine productie en qPCR resultaten gaan we uit van een variatie (sigma (standaarddeviatie) tweezijdig) in uitkomst tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie.

Het aan te tonen effect (true difference of means, effect size) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Het betrouwbaarheidsinterval (alfa) wordt gesteld op 5% omdat we in deze experimenten voornamelijk geïnteresseerd zijn in het effect ten opzichte van de controle en niet tussen de groepen onderling. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 9 experimentele eenheden moeten gebruiken. ($9 \times 5 \times 10 = 450$ muizen)

Maximaal 2 meest veelbelovende kweekprotocollen zullen vervolgens worden getest in vivo in deel 2. Voor het transfereren van [REDACTED] met verschillende doses en frequenties zoals beschreven in deel 2 zullen gemiddeld [REDACTED] per ontvanger muis worden door gespoten. Uit een donor muis kunnen we ongeveer [REDACTED] kweken dus dit komt neer op 10 ontvanger dieren per donor en voor de 1176 ontvanger dieren in deel 2 betekend dit dus **118** muizen in totaal.

Ook zal van deze 2 methoden een microarray of een RNAseq analyse worden uitgevoerd op de [REDACTED] om een gedetailleerd beeld te krijgen van de genen die specifiek zijn voor [REDACTED]. Om voldoende RNA te verkrijgen voor de microarray analyse van de meest effectieve [REDACTED] (en de benodigde positieve en negatieve controles) zijn [REDACTED] cellen nodig van minimaal 3 afzonderlijke kweken. Het aantal cellen is gebaseerd op de benodigde hoeveelheid RNA die uit de cellen geïsoleerd kan worden voor de analyse en de kwaliteitscontrole vooraf. De resultaten van drie afzonderlijke kweken worden vergeleken om de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de resultaten te bevestigen. Zonder de analyse van 3 afzonderlijke kweken kunnen de resultaten het gevolg zijn van variatie tussen de kweken en niet specifiek voor de vingerafdruk van de [REDACTED].

Inclusief alle controles (met en zonder [REDACTED] protocol, met en zonder pro-inflammatoire cytokines, met en zonder maturatie en negatieve controle) zijn dit 7 condities. In totaal zijn hiervoor dus 6 dieren nodig per conditie dus **12** dieren in totaal.

Naast donoren voor het kweken van de [REDACTED] zijn ook donor dieren nodig om de effectiviteit van de [REDACTED] te analyseren op basis van [REDACTED]. Hiervoor zullen we [REDACTED] muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer [REDACTED] geïsoleerd kunnen worden. Om het effect van [REDACTED] cellen te onderzoeken zullen we [REDACTED] cellen samen kweken met verschillende [REDACTED] en vervolgens analyseren op oppervlakte markers, cytokines en expressie van transcriptie factoren. Op basis van eerdere experimenten weten we dat voor deze analyses ongeveer [REDACTED] cellen nodig zijn per conditie (= 3 donoren). Het aantal condities dat we willen testen zijn de 10 verschillende [REDACTED] kweek protocollen in aan- of afwezigheid van proinflammatoire cytokines (om ontsteking na te bootsen in vitro), in aanwezigheid van enkele [REDACTED] liganden (om verschillende infecties na te bootsen) en in aanwezigheid van [REDACTED] (een gemodificeerd [REDACTED] ligand) zoals dit ook bij humane [REDACTED] wordt gebruikt voordat de cellen ingespoten worden bij de patiënten^(3,4).

In totaal komt dit dus neer op 5 verschillende condities * [REDACTED] protocollen * [REDACTED] cel donoren = **150** [REDACTED] donor muizen.

Aantal dieren:

Opzet: 50

Analyse oppervlakte markers etc.: $10 \times 5 \times 9 = 450$

[REDACTED] in vivo: 118

Microarray: 12 muizen

[REDACTED] donoren: $5 \times 10 \times 3 = 150$

Totaal aan tal dieren:

WT: 630 muizen

Tg: 150 muizen

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.

Door alle verschillende [REDACTED] kweekmethoden uit te testen in vitro en te kijken of de [REDACTED] onder deze condities [REDACTED] cellen kunnen induceren kunnen we het aantal verschillende [REDACTED] dat we in vivo zullen testen in modellen voor chronische ontsteking verminderen.

Het gebruik van een [REDACTED] cellijn is niet mogelijk. [REDACTED] cellijnen zijn zogenaamde 'end-stage' cellen en de bekende cellijnen ([REDACTED]) zijn allen representatief voor proinflammatoire [REDACTED] zoals die in de milt van de muis gevonden niet representatief voor [REDACTED]

Voor de muis zijn bij ons geen antigeen specifieke [REDACTED] cellijnen bekend die kunnen differentiëren tot [REDACTED] cellen, omdat deze cellen niet naïef zijn. Het gebruik van [REDACTED] cel hybridoma's is ook niet wenselijk omdat we dan alleen [REDACTED] cel activatie kunnen analyseren en geen inductie van [REDACTED] cellen of effectiviteit van een [REDACTED] cel.

In deze dierproef kiezen we muizen stammen die relevant zijn in het verdere onderzoek als ook het gebruik van [REDACTED] muizen om in meer detail het effect op [REDACTED] cel differentiatie te kunnen bekijken. Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. In alle gevallen zal eerst gedegen literatuur onderzoek gedaan worden om de meest veelbelovende [REDACTED] protocollen te selecteren.

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.

Alle dieren zullen zonder voorafgaande handelingen gedood worden volgens de geldende richtlijnen. De dieren zullen in groepen worden gehuisvest conform geldende normen van huisvesting en 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 > 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?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief van alle dieren in dit deel worden geclassificeerd als licht. Alle dieren gebruikt in deze dierproef worden zonder handelingen gedood en bij fok van ██████ receptor transgene muizen die in deze bijlage beschreven zijn geen klinische verschijnselen bekend of beschreven.

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.

Het doden van de dieren is noodzakelijk om donor cellen te verzamelen voor het uitvoeren van de experimenten zoals beschreven

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10800 | | | | |
|------------|---|---|------------|----------------|---|---|
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | | | | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten</td> </tr> </tbody> </table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | ███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | | |
| 2 | ███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten | | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van ███ als gekweekt onder deel 1 in het onderdrukken van een chronische ontsteking met de nadruk op het therapeutisch effectiviteit. In de literatuur zijn meerdere experimenten beschreven waarin gekeken is naar het effect van ███ therapie om chronisch ontstekingen voorkomen, maar nog weinig data is beschikbaar over het onderdrukken **tijdens** de ziekte. In dit deel zullen we kijken wat het ideale behandel protocol is van een chronisch ontsteking zoals artritis, met behulp van het proteoglycaan geïnduceerde artritis model^{0.a. 6, 8, 9, 11, 12}. Dit is een chronisch model waarbij het ziekte verloop intermitterend en relatief mild verloopt, vergelijkbaar als bij de mens. We hebben gekozen voor dit chronische model om juist het effect tijdens chronische ontsteking van ███ therapie te onderzoeken. Daarnaast hebben ███ met dit relatief lichte model.

Tevens zullen we in dit model ook het mechanisme onderzoeken met behulp van ███ muizen specifiek voor het ziekte inducerend antigeen, ███. Door zowel de effector ███ cellen (die de ziekte veroorzaken) als naïeve ███ cellen te labelen met een zogeheten 'vital dye' kunnen we deze cellen terug vinden in het dieren en met behulp van o.a. FACS analyse bepalen hoe de cellen beïnvloed zijn door de tolDC therapie. Op deze manier kunnen we beoordelen of ███ ook in vivo ███ cellen ███ specifiek kunnen induceren.

Om ███ cellen te induceren zullen we gebruik maken van peptiden die ███ kunnen induceren. Hierbij zullen we een ███ peptide gebruiken, waarvan bekend is dat het ziekte geïnduceerd tegen ███ kan voorkomen⁸. Maar ook een eerder door ███ peptide het ███ peptide. Dit ███ peptide kan antigeen specifieke ███ celen induceren in het proteoglycaan geïnduceerde artritis muis model onafhankelijk van het ziekte inducerend antigeen¹². De hypothese is dat dit ███ cellen induceert tegen verschillende

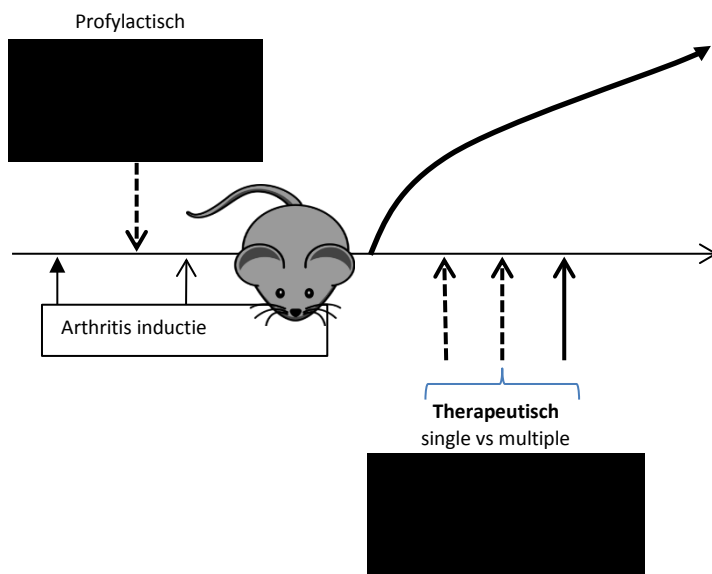
chronische ontstekingen. Initiële experimenten in transplantatie modellen in de muis laten inderdaad [] cel gemedieerde bescherming zien []).
 Juist dit aspect van [] therapie in combinatie met een peptide dat [] cellen induceert in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde zijn voor het ontwikkelen van [] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingen modellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking, door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten gehumaniseerd muis model. In dit wordt gebruik gemaakt van een [] muis waarin humane immuuncellen worden getransplanteerd om deze muis een humaan immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een transplantatie afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.

In deel 2 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

2a: Welke, dosis, frequentie, route, en timing van [] therapie is het meest efficiënt in het onderdrukken van chronisch ziekte. Als referentie zullen we een eenmalige profylactische (voor ziekte inductie) voor de toediening van [] nemen als vergelijking.

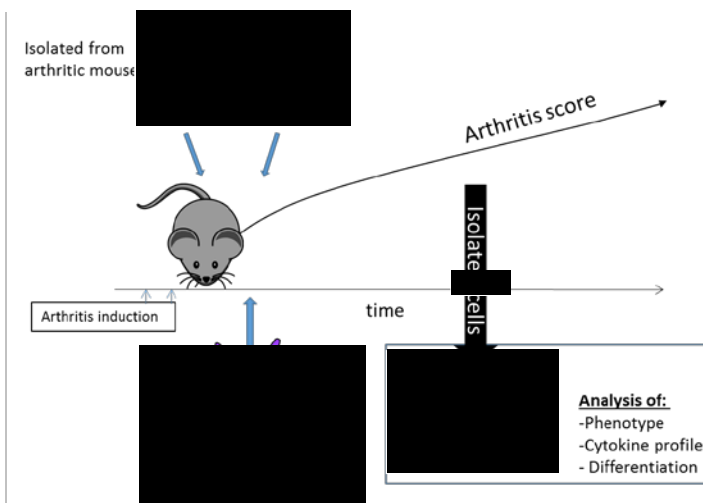
2b: Is [] therapie in staat om in vivo [] cellen te induceren en effector [] cellen te onderdrukken?

2c: werkt [] therapie ook in andere chronisch ontstekingsmodellen?



Figuur 1: [] worden op verschillende tijdstippen en in verschillende doses door gespoten.

Profylactisch zal slechts 1 dosis gekozen worden voordat de dieren ziekte ontwikkelen. Therapeutische toediening bij andere dieren zal starten zodra de eerste ziekte verschijnselen zichtbaar zijn, ongeveer een week na de 2^e immunisatie. Vervolgens zal het effect op artritis verloop worden beoordeeld door de dieren meerdere keren per week te beoordelen op artritis verschijnselen.



Figuur 2: Arthritis wordt geïnduceerd door 2 injecties met humaan proteoglycaan in met adjuvans DDA. Vervolgens worden [redacted] cel receptor [redacted] cellen uit verschillende muizen gelabeld met verschillende "Vital Dyes" en door gespoten net als de [redacted]. Door proteoglycaan [redacted] cellen door te spuiten kan het effect op [redacted] cellen worden geanalyseerd en de [redacted] cellen geven een beeld van de [redacted] cellen.

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.

- Het arthritis model:
- Proteoglycaan geïnduceerde arthritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van arthritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn¹⁸.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van arthritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren arthritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens arthritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

Dieren die behandeld worden met [redacted] therapie zullen tussen de 1 en maximaal 5 injecties krijgen afhankelijk van welke experimentele groep de dieren zitten. Deze injecties met tussen de [redacted] (zoals bij de mens in de [redacted]) gegeven worden. Voor profylactische controle behandeling zullen dieren eenmalig ongeveer [redacted] krijgen vlak voor de 2^e immunisatie voor arthritis inductie.

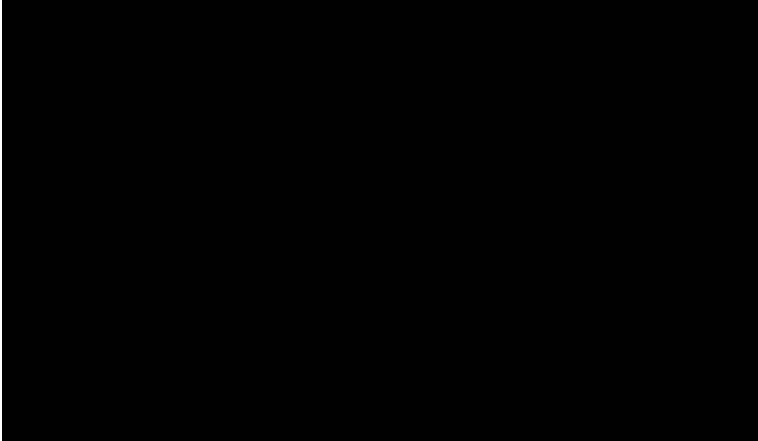
Dieren uit deel 2b waarbij het effect op [redacted] cellen wordt bekeken zullen een dag voor de [redacted] therapie [redacted] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend. In deze experimenten zullen alleen effectieve routes en een eenmalige toediening van [redacted] gebruikt worden.

In het laatste deel zal gekeken worden naar de effectiviteit van [redacted] therapie in andere modellen voor chronische ontsteking. Hierbij zal 1 dosis [redacted] gekozen worden die effectief was in arthritis (deel 2a) en met een zo laag mogelijk frequentie van doorspuiten. Ook in de andere modellen van chronische ontsteking zal het ziekte verloop op meerdere dagen per week worden vervolgd (minimaal 2x per week).

De andere modellen voor chronische ontsteking waar mee gewerkt zal worden zijn een [redacted] model en atopische dermatitis.

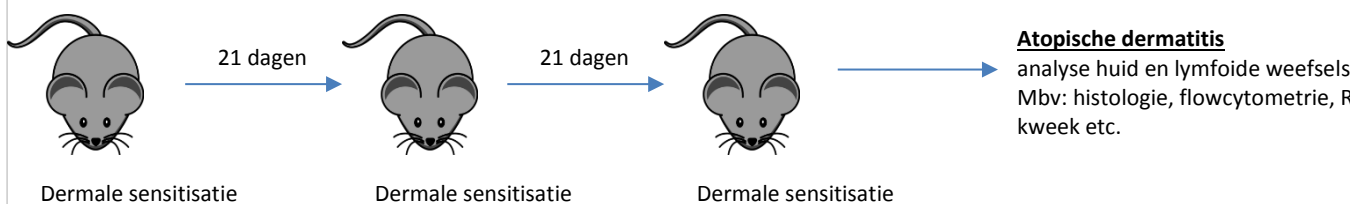
Het [redacted] model wordt uitgevoerd in samenwerking met de universiteit Nijmegen waar het

model ontwikkeld is. In dit model wordt op een immunodeficiënte muis onder narcose. Na 3 weken als de graft geaccepteerd is worden humane cellen doorgespoten en op dat moment zal ontsteking ontstaan in het transplantaat. Vervolgens zal de therapie worden ingezet door door te spuiten (in dit geval natuurlijk humane). Deze dieren worden vervolgens regelmatig (tot zelfs dagelijks) beoordeeld op afstoting van de huid. Na 3 weken zal de huid en de lymfoïde organen van de dieren geïsoleerd worden en beoordeeld op ontsteking, infiltraat en functionele differentiatie van de T cellen zoals te meten aan cytokine productie en transcriptie factor gebruik.



Figuur 3: Schematische weergave van het model. wordt onder narcose op een muis. Na 3 weken is de graft geaccepteerd en wordt een in de muis gebracht door het bloed cellen van een bloeddonor. Gedurende 3 weken wordt gekeken naar het ontwikkelen van ontsteking. Na 3 weken worden de en de lymfoïde organen geïsoleerd en de en immunrespons geanalyseerd met behulp van flowcytometrie en histologie.

Het tweede model is een dermatitis model, hiervoor is gekozen omdat het hier een gemengde Th2/Th1 gemedieerde response betreft en bij artritis of transplantatie met name een Th1/Th17 response en dit zal laten zien of therapie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 tot 3 dermale sensitisaties met het allergeen in adjuvans met 3 weken tussen tijd. Na afloop wordt de huid geanalyseerd op infiltratie van ontstekingscellen en worden de lymfoïde organen geïsoleerd om de inductie van cellen te analyseren tegen het allergeen met o.a. kweek en flowcytometrie¹⁶. De therapie zal worden toegediend tussen de 2^e en de 3^e.



Figuur 4: schematische weergave van het dermatitis model. Muizen worden geschoren onder anesthesie en dermaal gesensitiseerd. Sensitisatie wordt 3 maal herhaald met tussenpozen van 3 weken en vervolgens worden huid en lymfoïde organen geïsoleerd voor analyse op ontwikkelen van cellen en huidontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De aannames en vergelijkingen zijn onder B nader

toegelicht.

B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdierleveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren van beide sexen gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van arthritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van arthritis¹⁸.

Aantallen deel 2a:

In dit deel willen we maximaal 3 verschillende doses, maximaal 3 verschillende frequenties (1x, 3x of 5x), meerdere routes (maximaal 3) testen als therapeutische mogelijkheden en dat vergelijken met een enkele profylactische dosis. Er is gekozen voor verschillende doses en verschillende frequentie om te kijken of hoger of herhaaldelijk doseren de effectiviteit kan verhogen. In de literatuur zijn meerdere routes beschreven voor het toedienen van celtherapie, het is echter nog niet bekend of het effect van celtherapie afhankelijk is van de route van toedienen.

Hierbij willen we 2 typen [redacted] die in bijlage 1 effectief [redacted] cellen induceerde in vitro testen op effectiviteit om in vivo [redacted] cellen te induceren en chronische ontsteking te onderdrukken.

Om de effectiviteit te bepalen worden [redacted] vergeleken met conventionele [redacted] in aan- en afwezigheid van het ziekte inducerend antigeen [redacted] of een anti-inflammatoir antigeen (zoals [redacted] eiwit). Om [redacted] te matureren en stabiliseren wordt in de literatuur gebruik gemaakt van een non-toxisch [redacted] ligand [redacted] ter controle zullen de [redacted] ook behandeld worden met dit humaan [redacted] ligand, hiermee beantwoorden we de vraag of dit inderdaad de effectiviteit en stabiliteit in vivo verhoogd..

Groepen:

1. conventionele [redacted] met antigeen
2. conventionele [redacted] zonder antigeen
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] 1 met [redacted] en antigeen
6. [redacted] 2 [redacted] en antigeen

Per toedieningsroute zullen deze 6 testgroepen met elkaar vergeleken worden. In dit geval is groep 1 de referentie populatie die beschreven is als effectieve profylactische toediening van [redacted] conventionele [redacted] en groep 2 een negatieve controle.

In totaal zijn dit dus $3 \times 3 \times 3 = 27$ therapie verschillende manieren van toedienen voor de 6 test groepen. In de analyse willen we groep 3 statistisch vergelijken met groep 1,2 en 5 en groep 4 met groep 1,2 en 6. Op deze manier analyseren we het effect van 2 [redacted] groepen afzonderlijk en niet direct met elkaar op deze manier zijn minder dieren nodig per analyse. De vergelijking tussen de groepen op basis van effectiviteit om [redacted] cellen te induceren zal in deel 2b bepaald worden.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in arthritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

In totaal zou dat voor dit deel $11 \times 6 \times 27 = 1782$ acceptor muizen

Aantallen deel 2b:

In dit deel willen we de effectiviteit van de in bijlage 1 geselecteerde [redacted] beoordelen om in vivo

█ cellen te induceren tijdens ziekte.

Hier kiezen we voor een eenmalige toediening van de █ om de timing van █ cel activatie met zekerheid vast te kunnen stellen. Na transfer van █ cellen zullen maximaal 2 routes van █ worden geanalyseerd en zal de █ injectie op maximaal 3 verschillende tijdstippen gegeven worden. De keuze voor de routes zal gemaakt worden op basis van de resultaten uit deel 2a, hierbij zullen 2 effectieve routes geselecteerd worden. De verschillende tijdstippen zijn om te kijken of █ therapie meer █ cellen induceert wanneer deze vroeg in het ziekte verloop wordt gegeven ten opzichte van op latere tijdstippen. Het is de hypothese dat vroeg behandelen van patiënten net na ontwikkelen van de ziekte effectiever is dan later, deze hypothese kunnen we in dit experiment testen.

De derde vraag die we in dit deel willen beantwoorden is of een ziekte inducerend antigeen vergelijkbare █ cellen induceert als een █ antigeen zoals █ en we zullen deze direct met elkaar vergelijken.

Test groepen:

1. Conventionele █ met antigeen 1
2. Conventionele █ met antigeen 2
3. conventionele █ zonder antigeen (negatieve controle)
4. █ 1 met antigeen 1
5. █ 1 met antigeen 2
6. █ 2 met antigeen 1
7. █ met antigeen 2
8. █ met █ en antigeen
9. █ met █ en antigeen

In totaal hebben we hier dus 9 testgroepen, waarbij we 2 routes vergelijken en 3 tijdstippen van █ therapie. Voor het bepalen van de groepsgrootte gelden dezelfde aannames als in het vorige deel, met als verschil dat we in dit experiment meerdere vergelijkingen hebben. Hier willen we zowel de █ met elkaar vergelijken en betreft het 5 vergelijkingen, bijvoorbeeld groep 4 vergelijken we met groep 1,3,5,6 en 8. En groep 6 vergelijken we met groep 2,3,4,7 en 9.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in arthritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 5 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.01 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

Dit geeft dus $12 \cdot 9 \cdot 2 \cdot 3 = 648$ acceptor dieren

Deze dieren ontvangen ook █ cellen naast de █ therapie. Hiervoor zullen we █ cel receptor █ muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer █ cellen geïsoleerd kunnen worden. Dus om █ cellen te kunnen doorspuiten hebben we 2 donor muizen nog. Dit geeft dus $648 \cdot 2 = 1296$ donor dieren die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Aantallen voor deel 2c:

In dit deel willen we aantonen dat █ therapie ook effectief is in andere chronische ontstekingen waar een ander type ontsteking aan ten grondslag ligt. In dit geval is gekozen voor een atopische dermatitis model omdat dit een meer Th2/Th1 type ontsteking is en arthritis een Th17/Th1 type.

Groepen:

1. Conventionele █ met antigeen
2. conventionele █ zonder antigeen
3. █ 1 met antigeen
4. █ 2 met antigeen
5. █ 1 met █ en antigeen
6. █ 2 █ en antigeen

In dit deel zullen we slechts 2 therapie schema's testen die effectief [redacted] induceren in het artritis model. In het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) in ziekte score van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 8 dieren nodig hebben.

In totaal betreft het dan $8 \times 6 \times 2 = 96$ dieren

Om een translationele stap te kunnen maken is het essentieel om aan te tonen dat [redacted] therapie ook in het humane immuunsysteem in staat is [redacted] cellen te induceren. Hiertoe willen we gebruik maken van een muis transplantatie model, waarbij in immuundeficiënte muizen humane immuun cellen worden ingespoten samen met de [redacted] injectie.

Voor het humane transplantatie model is bekend dat de variatie rond de 20% ligt, de power wordt gesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen en het at te tonen verschil houden we op 50%. Bij een alfa van 0.017 door de bonferoni correctie, geeft dit een groeps grootte van 7 dieren per groep.

Groepen:

1. Conventionele [redacted] met antigeen
2. Geen celtherapie
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] 1 met [redacted] en antigeen
6. [redacted] 2 [redacted] en antigeen

In deze proeven willen we de therapie van [redacted] met [redacted] vergelijken met [redacted] en een negatieve controle groep zonder therapie.

Omdat het hier experimenten betreft die afhankelijk zijn van humane donoren speelt ook donor variatie mee in de uitkomst van het experiment. Om eventuele donor variatie te kunnen beoordelen zal het experiment 3 maal uitgevoerd worden met 3 afzonderlijke donoren.

In totaal betreft het dan $6 \times 7 \times 3 = 126$ muizen

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 1296

Artritis dieren: $1782 + 594 = 2376$

Overige ontstekingsmodellen: $96 + 127 = 223$

Totaal: **3895**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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.

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [REDACTED] [REDACTED] Wat is de meest effectieve therapie voor wat betreft dosering, frequentie van toediening of de timing tijdens het ziekteverloop voor een [REDACTED] therapie? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computermodellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

In het laatste deel wordt alleen gekeken naar het effect van op dat moment reeds bewezen therapeutisch toepassing van [REDACTED] in diermodellen voor chronische ontsteking waarmee ervaring is opgedaan door partners waarmee direct wordt samengewerkt of ervaring mee is binnen de eigen onderzoeksgroep.

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.

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 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.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immunoreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

In het geval van het transplantatie model zal het transplanteren van de huid onder algehele anaesthesie plaatsvinden met passende analgesie.

In het dermatitis model zullen de dieren onder gas anesthesie worden geschoren en gesensitiseerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis en transplantatie reactie zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het transplantatie model wordt als huumaan eindpunt necrose ten gevolge van afstoting van het transplantaat aangehouden.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt. Het dermatitis model is een progressief model en bij het ontwikkelen van jeuk zal deze niet verdwijnen, om de ontwikkeling van mogelijke secundaire infecties ten gevolge van krablaesies aan de huid te voorkomen beschouwen we de ontwikkeling van chronische jeuk als HEP.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur

wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt.

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

In het geval van artritis en transplantatie is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

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.

Donor dieren : licht ongerief

Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting gaan we ervan uit dat slechts de helft van de therapie effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot maximaal matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Transplantatie model: 40% licht ongerief en 60% tot matig ongerief

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.

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | | |
|-----|---|----------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10800 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 3 | Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van een therapeutisch vaccin bij chronische ziekten. In dit deel zullen de initiële experimenten ook weer gedaan worden in het proteoglycaan geïnduceerde arthritis model waarmee veel ervaring is (een typisch Th17/Th1 model) en zal in het vervolg ook gekeken worden naar de effectiviteit van een dergelijk [REDACTED] vaccin in een model voor dermatitis (een typisch Th2/Th1 model).

Om [REDACTED] cellen te induceren zijn verschillende methoden beschreven in de literatuur. Zo is het mucosaal immuunsysteem bekend om zijn [REDACTED] inducerende capaciteit in een profylactische setting. Recent zijn er meerdere aanwijzingen in de literatuur beschreven dat ook dermale toediening een goede route is om [REDACTED] cellen te krijgen. In dit deel van het project willen we ons voornamelijk richten op of we via de meest veelbelovende routes ([REDACTED]) [REDACTED] cellen kunnen induceren tijdens de aanwezigheid van een ontsteking, zoals bijvoorbeeld arthritis of dermatitis.

Door gebruik te maken van een [REDACTED] cel transfer model kunnen we het effect van de vaccinatie op [REDACTED] cel differentiatie in detail volgen. Daarnaast zullen we gebruik maken van een eerder [REDACTED] geïdentificeerd peptide: het [REDACTED] peptide. Dit peptide kan [REDACTED] celen induceren in het [REDACTED] geïnduceerde arthritis muis model [REDACTED] en mogelijk ook in andere ontstekingsziekten.

In deel 3 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

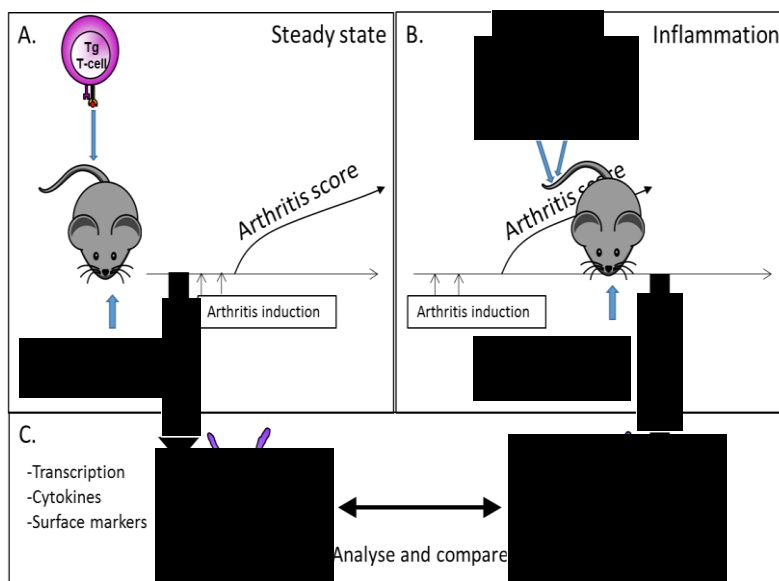
3a: is het mogelijk een chronische ontsteking te onderdrukken met een therapeutisch peptide vaccin met een tolerogeen adjuvans. Om deze vraag te beantwoorden zullen we verschillende adjuvantia testen. In ieder geval zullen we verschillende [REDACTED] onderzoeken omdat we eerder hebben aangetoond dat bijvoorbeeld PLGA nano-partikles tolerogene markers opreguleren in vitro in [REDACTED]. Maar ook [REDACTED] liganden en gemodificeerde [REDACTED] liganden worden in de literatuur aangewezen als potentiële [REDACTED]

adjuvantia

Om het effect van de [redacted] vaccinatie in vivo te beoordelen zullen we hierbij gebruik maken van adoptieve transfer modellen waarin we [redacted] cellen gelabeld met een vita dye doorspuiten en aan het eind van het experiment hun differentiatie en lokalisatie de muis kunnen beoordelen met behulp van FACS analyse.

De dieren zullen voor het ontwikkelen van ziekte gevaccineerd worden om de steady state vaccinatie te beoordelen en na induceren van de ziekte (na de laatste immunisatie) om de therapeutische effectiviteit vast te stellen.

3b. De andere belangrijke vraag die wil in dit deel van het project willen beantwoorden is wat is er anders is aan de [redacted] in vivo tijdens steady state en chronische ontsteking. In veel modellen is het goed mogelijk een profylactisch [redacted] vaccinatie toe te passen door bijvoorbeeld gebruik te maken van [redacted] [redacted] inductie. Echter tijdens ontsteking is dit veel minder effectief. Om deze verschillen in kaart te brengen willen we kijken welke [redacted] een rol spelen tijdens [redacted] inductie door een [redacted] vaccinatie te geven in conditionele knock-out muizen waarin we specifieke [redacted] subset kunnen uitschakelen met behulp van [redacted]). Daarnaast zullen we [redacted] isoleren na vaccinatie uit de drainerende lymfeknoten en deze vergelijken tussen dieren met een chronische ziekte en dieren zonder een chronische ontstekingsziekte.



Figuur 1:

Therapeutische en profylactische vaccinatie wordt vergeleken met de focus op [redacted] en [redacted] vaccinatie routes. Hierbij wordt het type [redacted] dat betrokken is bij de inductie in kaart gebracht met behulp van specifiek transgene muizen, maar ook door [redacted] te isoleren uit de drainerende lymfeklieren.

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.

- **Het arthritis model:**
- Proteoglycaan geïnduceerde arthritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van arthritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn¹⁸.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van arthritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren arthritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens arthritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul

- er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.
- Dieren waarbij het [REDACTED] wordt bekeken zullen een minimaal dag voor toediening van het vaccin [REDACTED] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend.
 - [REDACTED] vaccinatie ([REDACTED]) met ziekte inducerend antigeen ([REDACTED]) of [REDACTED] eiwit in aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvant zal voor of na de 2^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [REDACTED] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.
 - Het tweede model is een **dermatitis model**, hiervoor is gekozen omdat het hier een voornamelijk Th2 gemedieerde response betreft anders dan bij artritis dit zal laten zien of [REDACTED] vaccinatie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 of 3 sensitatie met allergeen met 3 weken tussen tijd gevolgd door een challenge op de huid. De sensitatie wordt [REDACTED] afhankelijk van het antigeen ([REDACTED]). Vervolgens worden de dieren gechallengeerd en wordt de ontwikkeling van huidontsteking op de plek van de challenge visueel beoordeeld. Alle dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden om de immuun relevante organen te isoleren voor verdere analyse in het laboratorium.
 - [REDACTED] vaccinatie (mucosaal of dermaal) met ziekte inducerend antigeen (ovalbumine of huisstofmijt) of [REDACTED] eiwit in aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvant zal voor of na de 2^e/3^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [REDACTED] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De exacte afwegingen en statistische berekeningen zijn hieronder verder uitgewerkt.

B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdier leveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis. In het geval van dermatitis is er geen geslachtsvoorkeur voor de dieren.

Aantallen deel 2a:

In totaal kunnen naar verwachting maximaal 10 verschillende adjuvantia testen. Enkele voorbeelden zijn [REDACTED] (mogelijk geladen met een [REDACTED]), anti-inflammatoire compounds als [REDACTED] of [REDACTED] liposomale formuleringen, anti-lichaam gemedieerde targeting van [REDACTED]⁴.

Hierbij willen we gebruik maken van 2 peptiden. Ten eerste het [REDACTED] waarvan [REDACTED] aangetoond dat het [REDACTED] in artritis en een tweede ziekte relevant peptide (bijvoorbeeld proteoglycaan peptide in artritis of ovalbumine in dermatitis).

Om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen we maximaal 3 verschillende doseringen testen per verschillend adjuvans. Het aantal doseringen is afhankelijk van de formulering van het vaccin en de concentratie peptide die hierin beschikbaar is voor het immuunsysteem en meetbare [REDACTED] cel activatie geeft van de ingespoten [REDACTED].

Per experiment hebben we een positieve controle nodig met een bekend immuunsuppressieve stof (bijvoorbeeld dexamethason) en een onbehandelde negatieve controle en kunnen we in totaal 5 testgroepen analyseren (met 2 controles erbij zijn dat 7 groepen per experiment).

Groepen:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2; negatieve controle
- Groep 3: test vaccin 1 dosis 1
- Groep 4: test vaccin 1 dosis 2
- Groep 5: test vaccin 1 dosis 3

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen* 12 dieren= **600** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de █ cel response willen vervolgd hebben maximaal **1200** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende █cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Dermatitis model:

Voor het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen* 9 dieren= **450** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de █ cel response willen vervolgd hebben maximaal **900** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende █cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Aantallen deel 3b:

In deel 3b zullen we ons richten op de █ die nodig is voor de inductie van de █ cel. In dit deel zullen we █ isoleren uit dieren die een chronische ontsteking en controle dieren kort na vaccinatie om de verschillen tussen deze █ in kaart te brengen. In deze vraagstelling is het niet noodzakelijk om verschillende diermodellen met verschillende ontstekingen te testen en beperken we ons tot het artritis model.

Hier willen we 2 effectieve vaccins testen (getest in 3a) via beide routes (█). Hierbij zullen de lymfeknopen geïsoleerd worden op 3 tijdstippen na vaccinatie om te analyseren of de █ veranderen over tijd na vaccinatie.

Groepen per experiment:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2: negatieve controle
- Groep 3: vaccin1 █
- Groep 4: vaccin 1 █

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference

of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 3 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.017. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

- Dit zijn dus **44** dieren per experiment.
- Per vaccin wordt dit experiment **6** maal uitgevoerd, namelijk de dieren worden op 3 tijdstippen na vaccinatie geanalyseerd en zowel tijdens steady state als tijdens een ontsteking.
- We willen 2 succesvolle (in 3a) vaccinaties testen

In totaal dus 2 vaccins * 6 experimenten * 44 dieren = **528** muizen).

En tevens zullen we 2 effectieve vaccin routes () en 2 effectieve formuleringen (bewezen in 3a) testen, samen met de juiste positieve (immunosuppressivum) als negatieve (ongevaccineerde) controle in zowel conventionele als conditionele knock-out muizen (2 stammen). In totaal zijn dit dus 6 groepen per stam dus 18 groepen van 12 dieren in totaal **216** dieren

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 2100

Artritis/dermatitis met vaccinatie: 600+450+528+216=1794

Totaal: **3894**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitskomst kan beïnvloeden

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.

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen () Kunnen deze ()? Via welke route is het mogelijk therapeutisch te vaccineren voor () Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

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.

Voor muizen waarbij artritis geïnduceerd is wordt er extra op gelet dat deze muizen extra voer in de kooi hebben liggen zodat ze niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Verder worden de muizen regelmatig gecheckt zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. Bij de andere muizen is de standaard 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.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immuunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

Scheren en sensibiliseren van de dieren voor dermatitis zal onder anaesthesie plaatsvinden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van arthritis score

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de arthritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de arthritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt..

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

In het geval van arthritis is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

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.

Arthritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

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.

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2015.II.811.050
2. Titel van het project : "Nieuwe immuun therapie voor chronische ontstekingen"
3. Titel van de NTS : Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 15-01-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 20-01-2016
- anderszins behandeld: per mail: 28-01-2016
- termijnonderbreking(en) van / tot : 22-01-2016 tot 28-01-2016
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 08-03-2016

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: 22-01-2016
- Strekking van de vragen:

Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: In de vijfde regel spreekt u over de patiënt, terwijl het over de muis gaat. Graag aanpassen, bijvoorbeeld naar 'het zieke dier'.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert u 'chronische ontstekingsziekten' te vervangen door 'chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten'. Graag aanpassen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC merkt op dat de grafiek onvolledig is opgenomen in de aanvraag (assen en invulling ontbreken), graag aanpassen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Deel 2: U noemt hier dat u maximaal twee kweekmethodes kiest, maar spreekt in bijlage 1 over drie methodes. Graag consistent invullen.

Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u meer aandacht te besteden aan de ratio van het opnemen van de twee andere ontstekingsmodellen. Tevens verzoekt de DEC u een go/no go-moment te beschrijven worden voor het gebruik van de andere modellen, inclusief de criteria. Graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u te benoemen dat het door u te gebruiken artritismodel een relatief licht model is.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u de samenhang tussen de verschillende modellen beter te beschrijven in de aanvraag.
- J. Humane eindpunten: De DEC acht het feit dat maximaal 70% van de dieren in het dermatitismodel het HEP bereikt, erg hoog. Graag uw visie.
- K. Classificatie van ongerief: De DEC verzoekt u toe te lichten dat de 75% gaat over de dieren in het dermatitismodel. Graag de classificatie uitsplitsen per model.

Bijlage 3

- J. Humane eindpunten: De DEC verzoekt u de humane eindpunten uit te splitsen naar de verschillende modellen.

- Datum antwoord: 28-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Dit is aangepast.

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: In alle gevallen is dit aangepast en met geel gemarkeerd.
- 3.1 Achtergrond: In de door ons her-ingediende versie zijn de assen zichtbaar.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Aangepast en met geel gemarkeerd.

Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De keuze voor de 2 modellen is gebaseerd op de hypothese dat [REDACTED] therapie bij meerdere typen ontstekingen effectief kan zijn in het induceren van [REDACTED] cellen en het herstellen van de immuun balans. We willen dit bevestigen door een [REDACTED] therapie die effectief is in het onderdrukken van artritis (een overwegend Th1 type ontsteking) te testen in een chronisch ontsteking model waaraan een ander type ontsteking ten grondslag ligt, namelijk het dermatitis model dat uitgaat van een TH2 type ontsteking. Daarnaast willen we ook bevestigen dat de door ons effectief geteste [REDACTED] therapie in de muis humaan relevant kan zijn. Hiervoor willen we gebruik maken van het humane transplantatie model waarbij een humaan immuunsysteem in de muis wordt gebracht en vervolgens de ontsteking reactie en de onderdrukking hiervan wordt geanalyseerd. Hoewel het hier wel een muis model betreft, krijgen we een beter beeld van de complexe interacties van het humane immuunsysteem. Juist dit aspect van [REDACTED] therapie in combinatie met een [REDACTED] in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde kunnen zijn voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [REDACTED] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingsmodellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking. Door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [REDACTED] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten gehumaniseerd muis model. In dit wordt gebruik gemaakt van [REDACTED] muis waarin humane immuuncellen worden getransplanteerd om deze muis een humaan immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een transplantatie afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [REDACTED] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Dat is toegevoegd aan de tekst.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: We hopen dat met het antwoord op de eerste vraag m.b.t. bijlage 2 en de bijbehorende aanpassingen in de projectaanvraag de samenhang tussen de modellen helderder is geworden.
- J. Humane eindpunten: Het klopt dat het aantal dieren dat in het dermatitis model het HEP bereikt erg hoog is. Dit is het gevolg van de formulering van het HEP. Het dermatitis model is een chronisch en progressief ontstekingsmodel en de ontsteking van de huid gaat samen met het ontwikkelen van jeuk. Het progressieve karakter van de ziekte betekend dat zodra de dieren jeuk krijgen gaat deze niet meer weg en zullen de dieren blijven krabben, met als gevolg dat dieren uiteindelijk ook de huid kunnen openkrabben. Aangezien we willen

voorkomen dat dieren eventueel secundaire infecties ontwikkelen hebben we gekozen voor een vroeg HEP, namelijk het ontwikkelen van de ziekte. Om dit te verduidelijken hebben we de tekst iets aangepast.

- K. Classificatie van ongerief: Dit is aangepast en toegelicht.

Bijlage 3

- J. Humane eindpunten: In bijlage 3 hebben we het ongerief van beide modellen genoemd. In bijlage 3 worden allen het artritis model en dermatitis model getest.
- 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 is in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. In chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is sprake van een foutieve immuun-regulatie waardoor een auto-immuun ontsteking plaatsvindt tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie bestaat uit algehele aspecifieke immuun-suppressie en gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie. Om de immuun-regulatie weer in balans te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED]

█ cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de immuunregulatie █. Er zijn verschillende manieren om █ in te zetten als mogelijke therapie voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten, namelijk als celtherapie of als vaccin. In diermodellen voor chronische ontsteking is aangetoond dat █ ziekte kunnen voorkomen en een initiële humane fase I trial dat het toedienen van █ in principe veilig is in artritis patiënten. Momenteel is het alleen niet bekend welke eigenschappen van de █ cruciaal zijn █ chronische ontstekingen. Het huidige project beoogt om de eigenschappen van *in vitro* gekweekte █ in kaart te brengen voor de ontwikkeling van een effectieve en veilige celtherapie. Daarnaast zal in dit project worden onderzocht of het mogelijk is een █ vaccin in te zetten om *in vivo* via █ en daarmee de immuun-balans te herstellen. De vaccinatie zorgt dat █ cellen geïnduceerd worden *in vivo* tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een █ adjuvans. Het ontwikkelen van mogelijke nieuwe therapieën om langdurige tolerantie te creëren en daarmee langdurig herstel van de immuun-balans in patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten wordt ingeschat als een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoeksgroep heeft ervaring met het kweken van █ afkomstig uit het beenmerg van muizen en aangetoond dat een bepaald type *in vitro* gekweekte █-cellen kan induceren. Het is nog onbekend of dit type *in vitro* gekweekte █ ook *in vivo* effectief is tijdens chronische ontstekingen. Op dit moment zijn verschillende protocollen gepubliceerd voor het kweken van █ die mogelijk *in vivo* chronische ontsteking kunnen onderdrukken. In het eerste deel van dit project (bijlage 1) zullen de verschillende protocollen met elkaar worden vergeleken en de effectiviteit en karakteristieken van de verschillende typen █ worden bepaald. De twee typen █ die het meest effectief zijn in het █-cellen zullen vervolgens worden ingezet als celtherapie in een model voor artritis (bijlage 2). Alleen het type █ (in 1 dosering) dat effectief is gebleken in het onderdrukken van ziekte in het artritis model zal vervolgens worden onderzocht in dermatitis en een gehumaniseerd muizenmodel (go/no-go moment). In de verschillende chronische ontstekingsmodellen die onderzocht worden zal een ander type ontsteking plaatsvinden, overwegend Th1 type ontsteking in artritis en een meer gemengde Th2 ontsteking in dermatitis. Voor het █ wordt █ huid naar █ muizen getransplanteerd waarna █ immuuncellen worden toegediend om zo in de muizen een █ immuunsysteem te creëren, vervolgens wordt de ontstekingsreactie bestudeerd. Door de effectiviteit van █ therapie in verschillende ontstekingstypen te onderzoeken kan bepaald worden of deze therapie in de toekomst voor verschillende chronische ontstekingsziekten kan worden ingezet. Met de kennis verkregen uit de *in vitro* en eerdere *in vivo* studies kan gericht bepaald worden welke █ cellen getarget moeten worden met een █ vaccin (bijlage 3). Hiervoor zullen █ gecombineerd worden met ziekte relevante antigenen en worden toegediend tijdens chronische

ontsteking *in vivo* (arthritis en dermatitis model). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen 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)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De muizen die dienen als donor voor de ██████ die gebruikt zullen worden in de experimenten beschreven in bijlagen 1 (100%), 2 (33%) en 3 (54%) ondervinden licht ongerief. Deze donormuizen worden zonder voorafgaande handelingen getermineerd. Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting van het ongerief wordt ervan uitgegaan dat de helft van de therapieën effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten. Het ongerief dat muizen ondervinden waarin chronische ontstekingsziekten worden geïnduceerd wordt als volgt ingeschat, in bijlage 2: 18% licht ongerief en 49% tot maximaal matig ongerief en in bijlage 3: 15% licht ongerief en 31% tot maximaal matig ongerief. Binnen het gehele project zal 62% van de muizen licht ongerief ondervinden en 28% maximaal matig ongerief.

Binnen het arthritis en transplantatie model wordt verwacht dat ongeveer 10% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Binnen het dermatitis model wordt verwacht 25-70% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Het dermatitis model is een chronisch en progressief ontstekingsmodel en de ontsteking van de huid gaat samen met het ontwikkelen van jeuk. Het progressieve karakter van de ziekte heeft tot gevolg dat wanneer de dieren jeuk krijgen deze niet meer weggaat en de dieren zullen blijven krabben, met als gevolg dat dieren uiteindelijk ook de huid kunnen openkrabben. Daarom is ervoor gekozen dat met het ontwikkelen van ziekte het humane eindpunt is bereikt.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Door de complexiteit van een immuunrespons is het niet mogelijk deze met een computermodel te simuleren. Zowel voor ██████ cellen zijn geen cellijnen beschikbaar die *in vivo* studies kunnen vervangen. Het gebruik van ██████ ██████ hybridoma's is niet wenselijk omdat in deze hybridoma's alleen ██████-cel activatie geanalyseerd kan worden en niet de inductie of effectiviteit van ██████ cellen.

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. Om het aantal *in vivo* te testen [REDACTED] te beperken, zullen de verschillende typen [REDACTED] eerst uitvoerig *in vitro* worden bestudeerd en gekarakteriseerd.
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. Alleen de effectief gebleken therapeutische toepassing van [REDACTED] zal in diermodellen voor chronische ontsteking worden bestudeerd. Het gehumaniseerde muizenmodel voor transplantatie is gekozen om de complexe interacties van het humane immuunsysteem beter te kunnen onderzoeken wat essentieel is voor de translatie naar de humane patiënt.
Voor het dermatitis en transplantatie model zullen volwassen muizen van beide seksen gebruikt worden met een leeftijd tussen de 6-12 weken, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in arthritis model zullen muizen ouder dan 16 weken en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen worden gebruikt, omdat deze vrouwelijke muizen de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van arthritis. De DEC heeft gediscussieerd over het geslacht van de dieren. Gezien het feit dat er sprake is van een proof-of-concept studie, kan de DEC zich vinden in de argumentatie om in het arthritis model te kiezen voor het gebruik van één sekse.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

De DEC is unaniem van mening dat het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van dit project opweegt tegen het ongerief dat de muizen zullen ondervinden. De huidige behandeling van patiënten met chronische ontstekingsziekten waarbij de balans van immuunsysteem verstoord is, is gebaseerd op het onderdrukken van het immuunsysteem en gaan gepaard met bijwerkingen zoals het frequenter ontstaan van infecties en tumoren. De DEC is van mening dat het uitgebreid onderzoeken en karakteriseren van [REDACTED] zal bijdragen aan het ontwikkelen van mogelijke therapeutische toepassingen voor het behandelen van patiënten met chronische ontstekingsziekten zoals [REDACTED] celtherapie of vaccinatie gericht op [REDACTED]. Het gebruik van verschillende diermodellen voor chronische ontsteking waarbij dieren licht (62%) tot matig ongerief (28%) ondervinden is in de ogen van de DEC noodzakelijk om de effectiviteit van [REDACTED] therapie in verschillende typen ontstekingen die plaatsvinden bij chronische ontstekingsziekten te bepalen. Voor het inzetten van meerdere ontstekingsmodellen zijn duidelijke criteria voor go-no go momenten bepaald. De mogelijkheden tot vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven zijn onderzocht en optimaal toegepast binnen de onderzoeksstrategie. Daarnaast zijn de humane eindpunten zo bepaald dat de muizen onnodig ongerief bespaard blijft. Dit alles brengt de DEC tot

het oordeel dat het belang van de doelstellingen opweegt tegen het lichte tot matige ongerief dat de muizen in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de muizen ethisch aanvaardbaar is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Dierexperimentencommissie Utrecht



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002016467

Bijlagen

2

Datum 17 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016467. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens 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 2016
Geplande einddatum: 1 mei 2021
Titel project: Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekte
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec.utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.441,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: 
Plaats: Utrecht
Datum: 14 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002016467
Bijlagen
2

Datum 17 maart 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 17 maart 2016
Vervaldatum: 16 april 2016
Factuurnummer: 16700467
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving | Bedrag |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002016467 | € 1.441,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

████████████████████
████████████████████
Postbus 12007
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002016467

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 15 april 2016
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De Niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat een tikfout in 3.5 (en dat geldt als licht ongerief). U kunt binnen veertien dagen een nieuwe Niet technische samenvatting sturen. Indien uw aanvraag wordt toegewezen zal de nieuwe Niet technische samenvatting op onze website geplaatst worden, of de bij uw aanvraag ingestuurde versie indien u geen nieuwe Niet technische samenvatting stuurt. U kunt de Niet technische samenvatting aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Onduidelijkheden

- 1) In bijlage 1 beschrijft u niet of u mannelijke/vrouwelijke dieren of dieren van beide geslachten zult gebruiken. Graag dit vermelden en indien u gebruik maakt van slechts 1 geslacht, dit onderbouwen.
- 2) In bijlage 2 beschrijft u onder B voor artritis een totaal aantal van 1782+594 dieren, terwijl bij de bovenstaande beschrijving u uitgaat van 1782+648 dieren. Graag consistent maken en indien nodig de NTS hierop aanpassen.
- 3) In bijlage 2 beschrijft u onder B voor overige ontstekingsmodellen een totaal aantal van 96+127 dieren, terwijl bij de bovenstaande beschrijving u uitgaat van 96+126 dieren. Graag consistent maken en indien nodig de NTS hierop aanpassen.
- 4) In bijlage 2 beschrijft u geen verfijning van de dierproeven. Dit graag aanvullen.

- 5) In bijlage 3 beschrijft u wel verfijning voor het artritismodel, maar zegt u niets over verfijning van het dermatitis model. Graag aanvullen.
- 6) In bijlage 3 is niet ingevuld of er in het voorgaande gebruik sprake is van ernstig ongerief. Graag invullen.

Datum

15 april 2016

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002016467

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

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

3 Ondertekening

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



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.
- 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.

In de westerse wereld is er toename aan patiënten met **chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten** (zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis en dermatitis). Alleen reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van

alle volwassenen. Het probleem in deze chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is de foutieve immuun regulatie in deze patiënten, die zorgt voor het ontwikkelen van een auto-immune ontsteking gericht tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie in deze patiënten is gebaseerd op algehele aspecifieke immuun suppressie. Het levenslange gebruik van deze medicatie gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie, en is helaas niet effectief in alle patiënten.

De ideale therapie in dergelijke chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is het herstellen van de immuun balans door het herstellen van [REDACTED]. Helaas blijkt het [REDACTED] tijdens chronische ontstekingen lastig.

[REDACTED] cellen zijn cruciaal in de immuun balans. In veel chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is beschreven dat de [REDACTED] cellen verminderd aanwezig zijn of verminderd functioneel zijn. Door het activeren of induceren van [REDACTED] cellen gericht tegen het ziekte inducerend-antigeen kan de immuun balans hersteld worden¹. [REDACTED] zijn hierbij van groot belang. [REDACTED] spelen een centrale rol in het immuunsysteem en zijn essentieel voor de inductie van een effectieve [REDACTED] cel response tegen pathogenen maar ook voor het [REDACTED] cellen in de periferie en hierdoor dragen ze bij aan het behoud van de immuun balans².

Het exploiteren van [REDACTED] cellen als target voor immuuntherapie kan op verschillende manieren. Ten eerste kan je [REDACTED] cellen die zogeheten [REDACTED] eigenschappen hebben gebruiken als **celtherapie**. Initiële studies laten zien dat met behulp van deze [REDACTED] ziekte kan worden voorkomen in diermodellen voor chronische ontstekingen^{3,4,5}. Daarnaast heeft een initiële fase I trials in [REDACTED] in de mens laten zien dat het geven van [REDACTED] therapie in principe veilig is in arthritis patiënten. Zij hebben geen bijwerkingen gezien tijdens de trial maar de effectiviteit kon niet beoordeeld worden in deze trials (persoonlijke communicatie).

Het probleem is dat het onduidelijk is wat de effectiviteit van een dergelijke [REDACTED] therapie tijdens chronische ontstekingen bepaald en aan welke criteria, op zowel moleculair als eiwit niveau, de [REDACTED] moet voldoen om in een patiënt met een chronische (auto-immuun) ziekte effectief en veilig te zijn. Een tweede manier om [REDACTED] cellen te gebruiken als mogelijk therapeutische route is door het ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin. Wat we hiermee bedoelen is een vaccinatie die zorgt dat er [REDACTED] cellen geïnduceerd worden in vivo tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvans of het gericht vaccineren via [REDACTED] routes. Vele studies hebben laten zien dat profylactisch vaccineren via mucosale routes met zelf-antigenen ziekte inductie kan voorkomen. Het therapeutisch vaccineren tijdens ziekte is echter veel minder effectief. De hypothese is dat de in vivo aanwezige [REDACTED] tijdens een chronische ontsteking veranderd zijn, maar ook hier zijn de exacte eigenschappen van de [REDACTED] cellen onbekend.

Voor dat een effectieve immuuntherapie met behulp van [REDACTED] in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten ontwikkeld kan worden is het dus cruciaal dat de eigenschappen van [REDACTED] goed in kaart worden gebracht en dat de effectiviteit van verschillende directe en indirecte therapieën vergeleken worden **tijdens** chronische ontsteking.

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?

1. Wat zijn de karakteristieken van en in vitro gekweekte [REDACTED] cellen [REDACTED] tijdens chronische ontsteking.

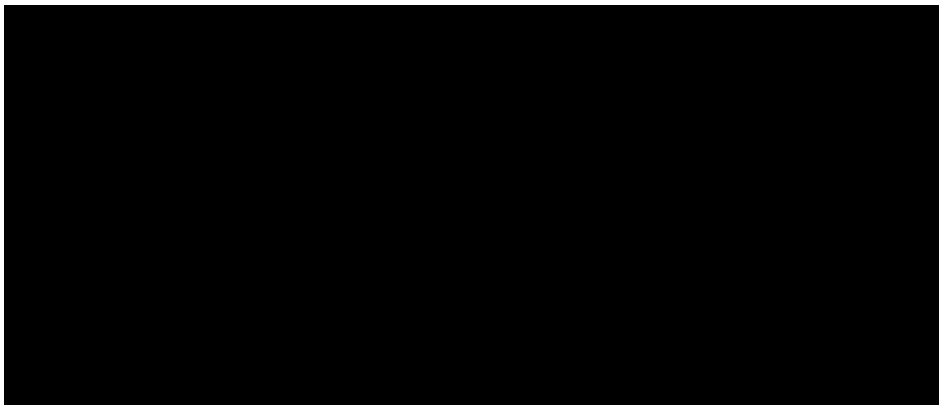
Het beantwoorden van deze vraag zal een grote stap voorwaarts opleveren voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie. Voor het veilig en effectief ontwikkelen van [REDACTED] therapie is het essentieel

om te weten welke factoren een [redacted] definiëren op eiwit niveau en moleculair niveau en op het niveau van cel-cel interactie. Momenteel is het niet bekend welke eigenschappen van de [redacted] cruciaal zijn om functioneel [redacted] te induceren tijdens chronische ontstekingen. Ook is onbekend welke factoren bepalen dat een [redacted] niet verandert van functie na inspuiten bij een chronische ontsteking. Dit laatste is natuurlijk cruciaal voor veilige therapie, want als een [redacted] kan veranderen kan de effectiviteit van de therapie verminderen of in het ergste geval zelfs de ziekte verergeren⁴. Andere vragen die beantwoord moeten worden voordat een effectieve [redacted] celtherapie in de mens kan worden toegepast tijdens ziekte, is wat de ideale omstandigheden zijn voor therapie zoals, route van toediening, frequentie van behandeling, dosis van behandeling, antigeen belading van de [redacted] en welk kweek protocol het meest effectief is.

2. Kunnen we tijdens chronische ontsteking een [redacted] vaccin inzetten om in vivo via [redacted] [redacted] cellen te induceren en zo de immuun balans te herstellen.
In dit deel van het onderzoek zal gekeken worden of het mogelijk is een therapeutisch vaccin te ontwikkelen waarmee in [redacted] getarget kunnen worden en aan welke voorwaarden een dergelijk vaccin moet voldoen. Dit zal gedaan worden op basis van het maken van verschillende combinaties eiwit adjuvans en/of verschillende routes van toediening van het therapeutisch vaccin. Daarnaast zal ook gekeken worden naar het type [redacted] dat tijdens de vaccinatie bereikt wordt in vivo en welke [redacted] essentieel zijn voor een [redacted] vaccinatie.

Haalbaarheid:

In dit project willen we een aantal fundamentele vragen beantwoorden die nodig zijn voor het ontwikkelen van [redacted] therapie in de toekomst. Binnen de onderzoeksgroep hebben we al aangetoond met behulp van in vitro onderzoek dat een bepaald type in vitro gekweekte [redacted] cellen kunnen induceren (figuur 1), maar of deze cellen ook in vivo effectief zijn is onbekend.



Figuur 1: [redacted] zijn gekweekt vanuit beenmerg van muizen in aanwezigheid van [redacted] en [redacted]. Deze [redacted] hebben [redacted] moleculen aan het oppervlak ([redacted]) die zorgen voor [redacted] cellen. Daarnaast bleken [redacted] cellen gestimuleerd met deze [redacted] s meer [redacted] te hebben (een marker voor [redacted] cellen).

[redacted]. Uit dit onderzoek is gebleken dat [redacted] kunnen onderdrukken wanneer profylactisch toegediend, helaas bleken deze [redacted] niet in staat chronische (auto-immuun) ziekte te onderdrukken. In de literatuur zijn momenteel meerdere [redacted] kweek protocollen beschreven die mogelijk wel een chronische ontsteking kunnen onderdrukken en juist deze zouden we in detail willen bestuderen in dit project^{3,7}. Door het vergelijken van verschillende [redacted] protocollen en analyseren van de effectiviteit van verschillende [redacted] [redacted] tijdens chronische ontsteking, zowel in vitro als in vivo, kunnen we in dit project duidelijk aantonen welke [redacted] langdurig [redacted] kunnen induceren tijdens chronische ontsteking. Door het vergelijken van

de moleculaire en eiwit profielen van deze cellen kunnen we zeer gedetailleerd in kaart brengen aan welke eigenschappen een effectieve [REDACTED] moet voldoen. Deze kennis kan gebruikt worden om een biomarker te ontwikkelen voor het testen van [REDACTED] voor humane therapeutische toepassing. In humane geneeskunde is het belangrijk om, voordat de therapie wordt toegepast, te weten of de celtherapie effectief en veilig is iedere keer dat een individuele patiënt behandeld wordt.

Daarnaast is binnen de onderzoeksgroep de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van mogelijke [REDACTED] vaccinaties. We hebben hierbij onder andere gekeken naar [REDACTED] toediening van zelf eiwitten ter voorkoming van ziekte [REDACTED] of specifiek gericht targeten van [REDACTED]. Via beide routes werd het ontstaan van artritis verminderd door het induceren van [REDACTED] cellen. Helaas bleken beide methoden minder effectief als therapie dan profylactisch. Wat de oorzaak is van deze verminderde effectiviteit willen we graag uitzoeken door de [REDACTED] goed in kaart te brengen.

Een laatste punt waar we binnen de onderzoeksgroep naar gekeken hebben is of er mogelijk [REDACTED] adjuvantia beschikbaar zijn. Eerste aanwijzingen naar het gebruik van PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) partikels wees uit dat deze gebruikt kunnen worden om [REDACTED] inducerende capaciteit van een vaccin te verhogen [REDACTED], door het moduleren van [REDACTED] die behandeld werden met PLGA partikels brachten meer retinaldehyde dehydrogenase tot expressie, wat mogelijk een rol speelt in het induceren van regulerende T cellen¹¹.

Deze voorgaande studies die aansluiten bij de huidige aanvraag geven aan dat binnen de onderzoeksgroep de ervaring aanwezig is die noodzakelijk is voor het succesvol uitvoeren van het project.

Naast het gebruik van technieken en vaardigheden die beschikbaar zijn binnen de onderzoeksgroep zullen we gebruik maken van uitgebreide samenwerkingen nationaal en internationaal. Binnen het onderzoek naar [REDACTED] therapie is er vanuit de EU een werkgroep opgericht die AFFACT heet. In deze werkgroep wordt 2 maal per jaar overlegd over het onderzoek naar [REDACTED] en de problemen en oplossingen die men heeft gevonden. Als actieve deelnemers aan deze werkgroep zijn we snel op de hoogte van de nieuwste ontwikkelingen en kunnen hier actief op inspringen.

Voor het ontwikkelen van een [REDACTED] model zoals verderop beschreven in bijlage 2, zullen we gebruik maken van de expertise van de groep uit [REDACTED] die dit model heeft opgezet en daar eerst de techniek en het model leren voordat we dit zelf zullen toepassen.

3.3 Belang

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

Het wetenschappelijk belang van deze studie is dat momenteel niet bekend is aan welke parameters een [REDACTED] moet voldoen om veilig en effectieve therapie te effectueren tijdens een chronische ontsteking. Ook is momenteel niet bekend of het mogelijk is een [REDACTED] vaccin in te zetten als therapie tijdens chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten. Deze kennis is van groot belang om deze therapie in de toekomst mogelijk te maken. De ontwikkeling van een mogelijke biomarker die vooraf effectiviteit en veiligheid van de celtherapie kan voorspellen bij de individuele patiënt is van groot belang om deze vorm van therapie in de toekomst mogelijk te maken. Het maatschappelijk belang zit in het induceren van langdurige [REDACTED] in de groter wordende groep mensen met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten, zoals patiënten met reumatoïde artritis, dermatitis, diabetes, colitis of MS. De kennis vanuit deze studie kan bijdragen aan de toekomstige ontwikkeling van een langdurig herstel van de immuun balans in vele patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten op de lange termijn.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

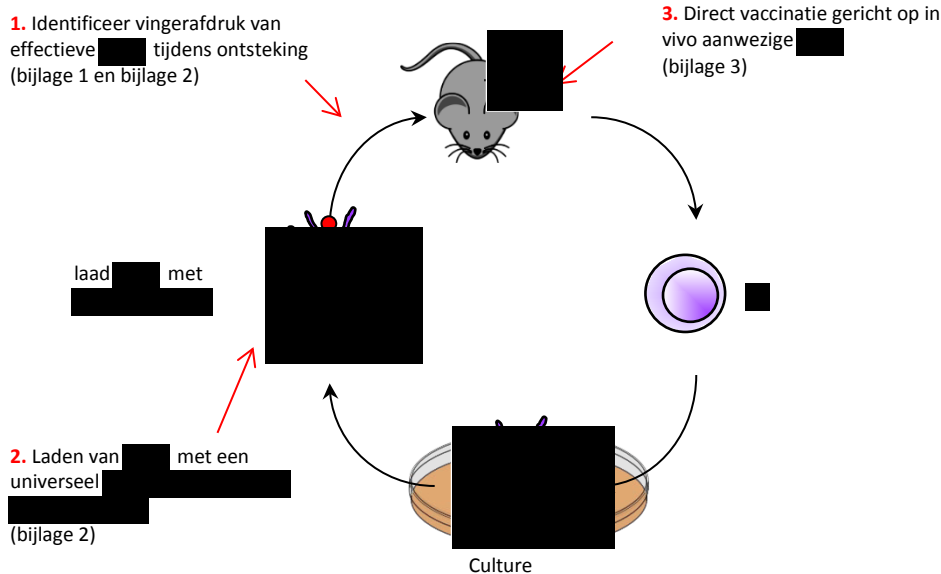
Binnen de studie willen we kijken of we een therapie kunnen ontwikkelen die een chronisch (auto-immuun) ontstekingsmodel zoals artritis kan onderdrukken.

In het eerste deel (bijlage 1) van het onderzoek willen we verschillende in vitro kweek protocollen voor het kweken van mogelijke [redacted] met elkaar vergelijken. In de literatuur zijn verschillende [redacted] protocollen beschreven [redacted]. Het betreft vaak een gemengde cel populatie waarin ook [redacted] aanwezig zijn¹³. Hoewel het voor het onderzoek belangrijker is dat de cellen [redacted] zijn dan welk [redacted] exact aanwezig is, zal dit wel meegenomen worden in de karakterisatie van de cellen. Door de protocollen met elkaar in vitro te vergelijken kunnen we de meest veelbelovende selecteren voor verder in vivo onderzoek. [redacted] zullen in vitro gekweekt worden en hun oppervlakte markers zullen gekarakteriseerd worden met behulp van flowcytometrie analyse. Tevens zullen we [redacted] productie en [redacted] analyseren. Deze [redacted] zijn van groot belang voor [redacted] en geven informatie over het functioneren van de [redacted]. Door het gebruik van qPCR, mRNA analyse en het gebruik van microarrays zullen we tevens de moleculaire vingerafdruk van deze cellen in kaart brengen. Juist deze laatste gedetailleerde analyse zal informatie geven welke unieke eigenschappen een [redacted] heeft. Naast het in kaart brengen van het fenotype van de gekweekte [redacted] willen we ook analyseren of de [redacted] in vitro [redacted] cellen kan induceren. Hiertoe zullen naieve [redacted] cellen (geïsoleerd uit een [redacted] muis) gekweekt worden in aanwezigheid van [redacted] en [redacted]. Na afloop zullen we de [redacted] cellen analyseren op expressie van markers die specifiek zijn voor [redacted] cellen, zoals [redacted], en hun [redacted] activiteit meten in een in vitro [redacted] assay.

In het verlengde (bijlage 2) hiervan willen we de twee typen [redacted], die in bijlage 1 getest zijn en daar effectief bleken om [redacted] cellen te induceren gebruiken, als celtherapie in vivo in chronische ontsteking. Door de [redacted] geladen met een ziekte relevant antigeen in te spuiten in diermodellen voor chronische ontstekingen zoals artritis, dermatitis en [redacted], kan het ziekteverloop worden bestudeerd. Met behulp van [redacted] muizen kunnen we ook de inductie van [redacted] [redacted] cellen in vivo in detail volgen. Hiertoe worden [redacted] cellen geïsoleerd uit [redacted] muizen, gelabeld met een vitale fluorescente kleurstof en ingespoten in dieren met artritis. Deze cellen kunnen we aan het eind van de studie isoleren uit de immuun organen en bestuderen of ze [redacted] cel eigenschappen hebben gekregen.

In dit deel zullen we ook de effectiviteit van [redacted] (proteolycaan in artritis, of OVA en huisstofmijt in dermatitis) vergelijken met tolDCs geladen met [redacted]. Eerdere studies hebben laten zien dat [redacted] eiwitten verschillende chronische ontstekingen kunnen remmen en mogelijk als therapie ingezet zouden kunnen worden om [redacted] te induceren tegen chronische ontstekingen [redacted]. Om dit te bevestigen zullen we de met [redacted] [redacted] inspuiten in andere modellen voor chronische ontsteking zoals dermatitis in de muis. Om een translationele stap te zetten naar de mens willen we ook gebruik maken van een [redacted] [redacted] model voor [redacted]. In dit model worden [redacted] immuun cellen in een muis gespoten na een [redacted] en acceptatie van humane huid, de immuunreactie (afstotingsreactie) die hierdoor ontstaat is te onderdrukken met [redacted] cellen. Dit model is opgezet in [redacted] en zal ook in nauwe samenwerking worden uitgevoerd. Dit model zal uitwijzen of [redacted] [redacted] ook humaan effectief zijn in een gecompliceerde in vivo immuunreactie, deze stap is cruciaal voor toekomstige toepassing in humane geneeskunde.

Het laatste deel van de studie (bijlage 3) zal zich meer richten op het induceren van [redacted] cellen door direct te vaccineren met een [redacted] vaccin. Hiervoor willen we verschillende adjuvantia¹⁴ (bijvoorbeeld gemodificeerde [redacted] liganden, nanoparticles, nanoparticles met immuun [redacted] stoffen/ [redacted] etc.) combineren met ziekte relevante antigenen (zoals [redacted] [redacted] of proteoglycanen⁸ in het geval van chronische ontstekingen of artritis specifiek) en dieren behandelen tijdens de ziekte. Het voordeel van deze aanpak is dat een directe vaccinatie therapie niet afhankelijk is van celkweek in gespecialiseerde ziekenhuizen en dus breder ingezet kan worden en

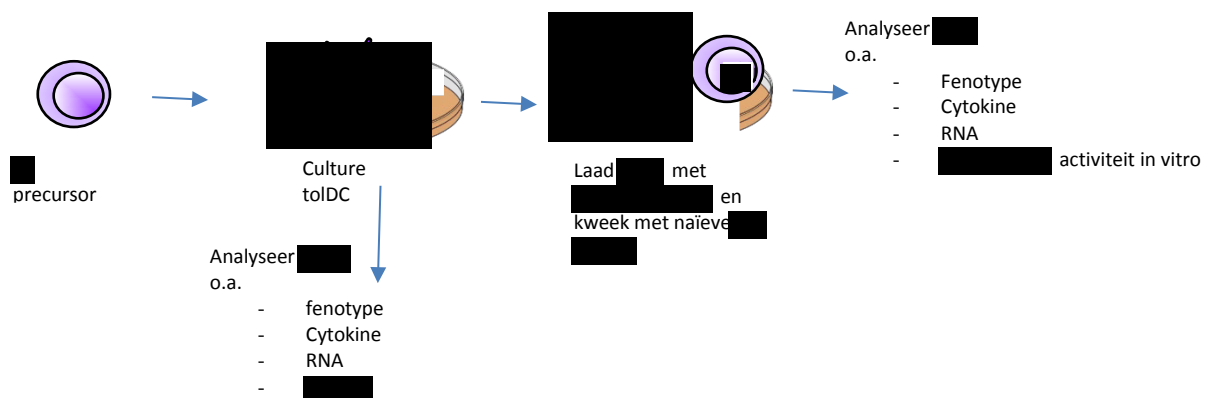


mogelijk meer patiënten kan bereiken. Met de kennis verkregen uit de andere twee delen kan gericht gekeken worden welke [redacted] cellen getarget moeten worden met een vaccin.

Figuur 2:

Schematische weergave van [redacted] kweek en therapie en de interactie tussen de verschillende bijlagen. [redacted] voorloper cellen worden geïsoleerd, in vitro gekweekt tot [redacted], [redacted] met [redacted]. Na analyse in bijlage 1 worden de cellen ingespoten in muizen met een chronische ontsteking in bijlage 2. In bijlage 3 wordt de mogelijkheid van celvrije therapie onderzocht door [redacted] in vivo te bereiken met behulp van een [redacted] vaccin.

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



Deel 1: In dit deel zullen we [redacted] organen uit naïeve muizen gebruiken als donor cellen voor het kweken van [redacted] in vitro. Het fenotype van de [redacted] zal beoordeeld worden met behulp van verschillende analyses zoals fluorescence activated cell sorting (FACS), microarray, luminex (voor eiwit en RNA productie), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en [redacted]. De in vitro functionaliteit zal beoordeeld worden met behulp van [redacted] cellen uit native donor muizen. Door [redacted] met een antigeen en [redacted] cellen te stimuleren kan beoordeeld worden wat voor [redacted] cel reactie [redacted] in vitro induceren.

Figuur 3: schematische weergave van de [redacted] in bijlage 1.

[redacted] precursors uit [redacted] in vitro, vervolgens worden deze direct geanalyseerd op uiterlijke kenmerken en vervolgens functioneel geanalyseerd door te kijken of ze

[redacted]. Dit wordt geanalyseerd door de [redacted] te bestuderen op fenotype, cytokine productie en ook [redacted] capaciteit in een [redacted] assay.

Deel 2: In het tweede deel zal bekeken worden of [redacted] zoals gekweekt in het eerste deel, functioneel zijn in vivo tijdens chronische ontstekingsreacties. Hier worden maximaal twee kweekmethoden gekozen, op basis van de effectiviteit van de [redacted] om in vitro [redacted] cellen te induceren. In eerst instantie zullen we dit in het proteoglycaan geïnduceerde arthritis model testen. In dit model voor chronische arthritis in de muis wordt een immuunreactie tegen het kraakbeen opgewekt door inspuiten van het kraakbeeneiwit proteoglycaan en met dit model hebben [redacted] [redacted] [redacted]. Verder hebben we de beschikking over [redacted] muizen met een specificiteit voor het ziekte inducerend proteoglycaan. [redacted]

[redacted] Hier zullen we verschillende routes van toediening (intradermaal, s.c., i.v. etc.), timing, frequenties (enkelvoudig of meervoudig) en de verschillende antigenen (bijvoorbeeld [redacted] [redacted]) met elkaar vergelijken en uitlezen op effectiviteit om de ontsteking te onderdrukken. Hierbij willen we ook het mechanisme van de therapeutische effectiviteit in kaart brengen met behulp van [redacted] cel [redacted] naar de dieren met arthritis en kijken of er inderdaad [redacted] worden en mogelijk de ziekte wordt [redacted] door deze cellen. Door de verschillende [redacted] cellen met congene markers te gebruiken en voor het transfereren te labelen met verschillende vitale fluorescente labels kunnen we deze in vivo vervolgen en aan het einde van het experiment in vitro verder analyseren. De protocollen die het meest effectief blijken willen we vervolgen ook testen in andere modellen voor chronische ontsteking zoals bijvoorbeeld [redacted] en atopische dermatitis¹⁶. Voor het [redacted] model is gekozen omdat dit een [redacted] model is waarin de [redacted] afweerreactie [redacted] bestudeerd kan worden. Dit model zal in nauwe samenwerking met een onderzoeksgroep in [redacted] worden uitgevoerd, omdat deze groep ervaring heeft met dit model. Het dermatitis model is gekozen omdat dit een chronisch ontstekingsmodel is waarmee ervaring is binnen de vakgroep en omdat dit model een ander type ontsteking geeft dan arthritis. Arthritis is een meer Th1 type ontsteking, terwijl dermatitis een meer gemengd Th2, Th1 beeld geeft. Door juist verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [redacted] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. In het geval van onderzoek bij dermatitis zal het ziekte inducerend antigeen ([redacted]) vergeleken worden met [redacted] eiwit.

Deel 3: In het laatste deel willen we een [redacted] vaccin testen. Het is bekend dat via bepaalde routes [redacted] in vivo getarget kunnen worden. Bijvoorbeeld via [redacted] of [redacted] vaccinatie routes. Het is echter moeilijk om tijdens chronische ontsteking deze [redacted] te bereiken. Om dit te verbeteren willen we een vaccin combineren met een [redacted] adjuvans. De keuze voor de [redacted] adjuvantia zal gemaakt worden op basis van literatuur en eerdere resultaten vanuit de onderzoeksgroep. Een voorbeeld is [redacted] deze induceren een [redacted] in vitro^{10,11}. Door [redacted] te combineren met [redacted] via een [redacted] route is het mogelijk een [redacted] vaccin te maken. Naast [redacted] willen we ook [redacted] liganden, PLGA en andere [redacted] al dan niet geladen met anti-inflammatoire hulpstoffen (denk hierbij aan antilichamen of [redacted] tegen ontstekingsmediatoren zoals [redacted]) of nieuwe [redacted] adjuvantia testen. Ook in dit deel van de studie zullen we het mechanisme van het vaccin en de effectiviteit van [redacted] cel inductie monitoren met behulp van de verschillende [redacted] muismodellen. Tevens zal met behulp van verschillend conditionele knock-out muizen waarin specifieke [redacted] cellen kunnen worden uitgeschakeld gekeken worden welke [redacted] in vivo essentieel is voor het bereiken van een [redacted] effect. Wanneer het [redacted] effectief is als [redacted] vaccin willen we dit herhalen in andere chronische ontstekingsmiddelen zoals, transplantatie en atopische dermatitis. Dit zijn ook modellen waar in de [redacted] een belangrijke rol speelt tijdens de ontstekingen [redacted]

Referentielijst DEC aanvraag [REDACTED]

Referenties:

1. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562
2. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., & Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 549-559.
3. Hilkens, C. M., Isaacs, J. D., & Thomson, A. W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*, 29(2), 156-183.
4. Hilkens, C. M. U., & Isaacs, J. D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now?. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 148-157.
5. Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3656-3665.
6. Spiering, R., Van Der Zee, R., Wagenaar, J., Kapetis, D., Zolezzi, F., Van Eden, W., & Broere, F. (2012). Tolerogenic dendritic cells that inhibit autoimmune arthritis can be induced by a combination of carvacrol and thermal stress. *PLoS one*, 7(9), e46336.
7. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*, 241(1), 206-227.
8. Broere, F., Wieten, L., Koerkamp, E. I. K., van Roon, J. A., Guichelaar, T., Lafeber, F. P., & van Eden, W. (2008). Oral or nasal antigen induces regulatory T cells that suppress arthritis and proliferation of arthritogenic T cells in joint draining lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 181(2), 899-906.
9. Spiering, Rachel, et al. "DEC205+ Dendritic Cell-Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis." *The Journal of Immunology* 194.10 (2015): 4804-4813.
10. Keijzer, Chantal, et al. "PLGA nanoparticles enhance the expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in dendritic cells and induce FoxP3+ T-cells in vitro." *Journal of Controlled Release* 168.1 (2013): 35-40.
11. Keijzer, Chantal, et al. "PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity." *PLoS One* 6.11 (2011): e26684.
12. van Herwijnen, Martijn JC, et al. "Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.35 (2012): 14134-14139.
13. Helft, Julie, et al. "GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c+ MHCII+ macrophages and dendritic cells." *Immunity* 42.6 (2015): 1197-1211.
14. Keijzer, Chantal, et al. "Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases." *Frontiers in immunology* 4 (2013).
15. de Oliveira, Vivian L., et al. "Humanized mouse model of skin inflammation is characterized by disturbed keratinocyte differentiation and influx of IL-17A producing T cells." (2012): e45509.
16. Spergel, Jonathan M., et al. "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *Journal of Clinical Investigation* 103.8 (1999): 1103.
17. Van Eden, Willem, Ruurd Van der Zee, and Berent Prakken. "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." *Nature Reviews Immunology* 5.4 (2005): 318-330.
18. Glant, Tibor T., Alison Finnegan, and Katalin Mikecz. "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics." *Critical Reviews™ in Immunology* 23.3 (2003).
19. Hawkins, Penny, et al. "Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research." *Inflammopharmacology* 23.4 (2015): 131-150.
20. Hish Jr, Gerald A., et al. "Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 53.5 (2014): 485.

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.

Deel 1: De data uit deel 1 zullen gebruiken om de [REDACTED] kweek methoden voor deel 2 te optimaliseren.

Deel 2: slechts twee van de [REDACTED] protocollen die in deel 1 het meest effectief [REDACTED] zullen ook daadwerkelijk in vivo getest worden op therapeutische effectiviteit. De meest [REDACTED] zal vervolgens in deel 1 in nog meer detail bekeken worden met behulp van microarray analyse

Deel 3: De kennis van de eigenschappen van [REDACTED] uit 1 en 2 zal bijdragen aan mogelijkheid om in vivo [REDACTED] te karakteriseren, daarnaast zullen de kritische eigenschappen voor een [REDACTED] helpen in de zoektocht naar een effectief [REDACTED] vaccin.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | In vitro kweek van ██████████ en analyse van fenotype en functie |
| 2 | █████████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| 3 | Ontwikkelen van een ██████████ vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10800 | | | | |
|--|--|------------|----------------|---|--|
| Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | | | | |
| Vul het volgnummer en het type dierproef in. | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>In vitro kweek van [redacted] en analyse van fenotype en functie</td> </tr> </tbody> </table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | In vitro kweek van [redacted] en analyse van fenotype en functie |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | |
| 1 | In vitro kweek van [redacted] en analyse van fenotype en functie | | | | |

Gebruik de volgnummers

1.1

1.2

1.3

van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In auto-immuun ziekten valt het immuunsysteem cellen van het lichaam zelf aan. De belangrijkste reden voor dit probleem is dat de regulatie van het immuunsysteem niet goed meer werkt. Om deze regulatie weer op orde te krijgen kunnen () worden gebruikt. Deze () cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de regulatie en tolerantie. Eén van de mechanismen die de () kunnen gebruiken is het induceren van () cellen (). Op deze manier kunnen specifieke immuun responsen worden onderdrukt.

In het eerste deel zullen we verschillende in vitro kweek methoden om () te kweken met elkaar vergelijken. Hiertoe worden () precursors geïsoleerd uit naïeve muizen die worden gedood zonder voorafgaande handelingen en vervolgens worden de cellen gekweekt in vitro.

De effectiviteit van de () in vitro zal uitgelezen worden met behulp van FACS, PCR en luminex, waarbij expressie van oppervlakte markers, () en gebruik van verschillende transcriptie factoren wordt beoordeeld. Daarnaast zal ook worden bestudeerd hoe effectief de () zijn in het induceren van () cellen. Dit zal worden getest via een co-culture van de () met () receptor transgene () cellen welke een bekende specificiteit hebben, zoals weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. () cellen met een () cel receptor worden geïsoleerd uit naïeve muizen specifiek voor de () die gedood worden zonder voorafgaande handelingen. Daarnaast is er momenteel geen helder raamwerk bekend waaraan een veilige effectieve () moet voldoen, de zogeheten () vingerafdruk. Deze vingerafdruk zullen we in kaart brengen van de 2 meest effectieve kweek methoden, die het best () cellen induceren in vitro en tevens effectief zijn in vivo (getest in bijlage 2). Het in kaart brengen zal gebeuren door een uitgebreide analyse uit te voeren met behulp van microarrays en RNA sequencing. Deze vraagstukken zullen beantwoord worden door middel van de experimenten zoals beschreven in deze bijlage.

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

Alle dieren in dit deel van de projectaanvraag zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood en vervolgens zullen de lymfoïde organen gebruikt worden voor het isoleren van () cellen en () cellen.

Alle analyses zullen in vitro worden uitgevoerd.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De parameters zijn per primaire uitkomst parameter voor de power analyse zijn toegelicht hieronder.

B. De dieren

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

Voor deze experimenten zal als diersoort de muis (tussen 6-12 weken oud) gebruikt worden. In eerdere experimenten is gebleken dat het kweken van [REDACTED] uit beenmerg van muizen van deze leeftijd het meest succesvol is en de hoogste opbrengst gegenereerd. Als donor muizen voor de [REDACTED] wordt gebruik gemaakt van veel gebruikte muizen stammen zoals Balb/c, C57BL of F1 van beide stammen. Deze dieren worden aangekocht van erkende proefdierleveranciers. Deze stammen worden gebruikt omdat op deze manier de data vergelijkbaar zijn met data uit de literatuur en omdat deze stammen ook gevoelig zijn voor de ontstekingsmodellen beschreven in bijlage 2. Zo wordt het proteoglycaan arthritis model geïnduceerd in Balb/c en beide stammen zijn gevoelig voor dermatitis, maar met een hogere incidentie in C57BL model. De [REDACTED] muizen die hieronder besproken worden zijn afkomstig uit eigen fok. De muizen zijn transgeen voor een [REDACTED] receptor specifiek voor bijvoorbeeld [REDACTED] of ovalbumine, de relevante eiwitten voor de modellen die in bijlage 2 getest zullen worden. Voor de donor dieren kunnen per experiment zowel vrouwelijke als mannelijke dieren worden ingezet; er is daarbij geen voorkeur voor een van beide geslachten; de leverancier mag bepalen welke dieren geleverd worden.

Om [REDACTED] te kweken zijn beenmerg donoren nodig aangezien de [REDACTED] worden gekweekt.

In het project willen we maximaal 10 verschillende (reeds in de literatuur beschreven) [REDACTED] protocollen vergelijken³. Verschillende kweekmethoden geven verschillende type cellen, en van enkele in het verleden beschreven [REDACTED] kweekprotocollen is bekend dat deze [REDACTED] zijn, maar niet functioneel [REDACTED] kunnen induceren tijdens ontsteking⁶. Juist dit laatste is cruciaal om effectief als [REDACTED] therapie ingezet te kunnen worden bij patiënten. Door meerdere protocollen en de verschillende cellen die tijdens de kweek ontstaan gedetailleerd te onderzoeken in vitro onder artificiële ontstekingscondities (toevoeging van o.a. ontstekingsmediatoren aan het kweekmedium) voor we deze in vivo testen willen we het aantal gebruikte dieren zoveel mogelijk beperken en alleen de meest veelbelovende cellen in vivo testen.

In het verleden is gebleken dat we voor het opzetten van een nieuwe kweek methode ongeveer 5 muizen nodig hebben als beenmerg donor ($5 \times 10 = 50$ muizen). Dit aantal is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia om de meest optimale cel aantallen na afloop van de kweek te verkrijgen, juist het kweken in aanwezigheid van [REDACTED] condities zorgt voor verminderde celopbrengsten (persoonlijke observatie). Naast het optimaliseren van de kweek condities is ook aantal cellen dat na afloop van de kweek beschikbaar is belangrijk voor analyse van oppervlakte markers, deze oppervlakte markers (bijvoorbeeld [REDACTED]) geven inzicht of de kweek daadwerkelijk [REDACTED] cellen heeft voortgebracht¹³.

Om voldoende [REDACTED] te kweken voor de analyse van de oppervlakte markers met behulp van FACS, cytokine productie en RNA met qPCR of [REDACTED] hebben we 5 donor dieren nodig. Dit is op basis van cel opbrengsten zoals we die in het verleden bepaald hebben binnen onze vakgroep na het kweken van [REDACTED]. Het mogelijk is dat niet alle kweekmethoden een zelfde hoeveelheid cellen zullen opleveren maar dit is vooraf niet met zekerheid vast te stellen.

Door ervaring uit eerdere experimenten met dergelijke parameters als cytokine productie en qPCR resultaten gaan we uit van een variatie (sigma (standaarddeviatie) tweezijdig) in uitkomst tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie.

Het aan te tonen effect (true difference of means, effect size) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Het betrouwbaarheidsinterval (alfa) wordt gesteld op 5% omdat we in deze experimenten voornamelijk geïnteresseerd zijn in het effect ten opzichte van de controle en niet tussen de groepen onderling. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 9 experimentele eenheden moeten gebruiken. ($9 \times 5 \times 10 = 450$ muizen)

Maximaal 2 meest veelbelovende kweekprotocollen zullen vervolgens worden getest in vivo in deel 2. Voor het transfereren van [REDACTED] met verschillende doses en frequenties zoals beschreven in deel 2 zullen gemiddeld [REDACTED] per ontvanger muis worden door gespoot. Uit een donor muis kunnen we ongeveer [REDACTED] kweken dus dit komt neer op 10 ontvanger dieren per donor en voor de 1176 ontvanger dieren in deel 2 betekend dit dus **118** muizen in totaal.

Ook zal van deze 2 methoden een microarray of een RNAseq analyse worden uitgevoerd op de [REDACTED] om een gedetailleerd beeld te krijgen van de genen die specifiek zijn voor [REDACTED]. Om voldoende RNA te verkrijgen voor de microarray analyse van de meest effectieve [REDACTED] (en de benodigde positieve en negatieve controles) zijn $10 \cdot 10^6$ cellen nodig van minimaal 3 afzonderlijke kweken. Het aantal cellen is gebaseerd op de benodigde hoeveelheid RNA die uit de cellen geïsoleerd kan worden voor de analyse en de kwaliteitscontrole vooraf. De resultaten van drie afzonderlijke kweken worden vergeleken om de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de resultaten te bevestigen. Zonder de analyse van 3 afzonderlijke kweken kunnen de resultaten het gevolg zijn van variatie tussen de kweken en niet specifiek voor de vingerafdruk van de [REDACTED].

Inclusief alle controles (met en zonder [REDACTED] protocol, met en zonder pro-inflammatoire cytokines, met en zonder maturatie en negatieve controle) zijn dit 7 condities. In totaal zijn hiervoor dus 6 dieren nodig per conditie dus **12** dieren in totaal.

Naast donoren voor het kweken van de [REDACTED] zijn ook donor dieren nodig om de effectiviteit van de [REDACTED] te analyseren op basis van [REDACTED] activatie en differentiatie. Hiervoor zullen we [REDACTED] muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer [REDACTED] [REDACTED] cellen geïsoleerd kunnen worden. Om het effect van [REDACTED] op de inductie van [REDACTED] cellen te onderzoeken zullen we [REDACTED] cellen samen kweken met [REDACTED] en vervolgens analyseren op oppervlakte markers, cytokines en expressie van transcriptie factoren. Op basis van eerdere experimenten weten we dat voor deze analyses ongeveer [REDACTED] cellen nodig zijn per conditie (= 3 donoren). Het aantal condities dat we willen testen zijn de 10 verschillende [REDACTED] kweek protocollen in aan- of afwezigheid van proinflammatoire cytokines (om ontsteking na te bootsen in vitro), in aanwezigheid van enkele [REDACTED] (om verschillende infecties na te bootsen) en in aanwezigheid van [REDACTED] [REDACTED] zoals dit ook bij humane [REDACTED] wordt gebruikt voordat de cellen ingespoten worden bij de patiënten^(3,4).

In totaal komt dit dus neer op 5 verschillende condities * 10 [REDACTED] protocollen * 3 [REDACTED] donoren = **150** [REDACTED] donor muizen.

Aantal dieren:

Opzet: 50

Analyse oppervlakte markers etc.: $10 \times 5 \times 9 = 450$

[REDACTED] in vivo: 118 Microarray: 12 muizen

■ cel donoren: $5 \cdot 10^3 = 150$ Totaal

aan tal dieren:

WT: 630 muizen

Tg: 150 muizen

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.

Door alle verschillende [REDACTED] kweekmethoden uit te testen in vitro en te kijken of de [REDACTED] onder deze condities [REDACTED] cellen kunnen induceren kunnen we het aantal verschillende [REDACTED] dat we in vivo zullen testen in modellen voor chronische ontsteking verminderen.

Het gebruik van een [REDACTED] cellijn is niet mogelijk. [REDACTED] cellijnen zijn zogenaamde 'end-stage' cellen en de bekende cellijnen ([REDACTED]) zijn allen representatief voor [REDACTED] zoals die in de milt van de muis gevonden niet representatief voor [REDACTED].

Voor de muis zijn bij ons geen [REDACTED] cellijnen bekend die kunnen differentiëren tot [REDACTED] cellen, omdat deze cellen niet naïef zijn. Het gebruik van [REDACTED] cel hybridoma's is ook niet wenselijk omdat we dan alleen [REDACTED] activatie kunnen analyseren en geen [REDACTED].

In deze dierproef kiezen we muizen stammen die relevant zijn in het verdere onderzoek als ook het gebruik van [REDACTED] muizen om in meer detail het effect op [REDACTED] cel differentiatie te kunnen bekijken. Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. In alle gevallen zal eerst gedegen literatuur onderzoek gedaan worden om de meest veelbelovende [REDACTED] protocollen te selecteren.

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.

Alle dieren zullen zonder voorafgaande handelingen gedood worden volgens de geldende richtlijnen. De dieren zullen in groepen worden gehuisvest conform geldende normen van huisvesting en 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 > 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?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn. n.v.t.

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

n.v.t.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Het ongerief van alle dieren in dit deel worden geclassificeerd als licht. Alle dieren gebruikt in deze dierproef worden zonder handelingen gedood en bij fok van [REDACTED] muizen die in deze bijlage beschreven zijn geen klinische verschijnselen bekend of beschreven.

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.

Het doden van de dieren is noodzakelijk om donor cellen te verzamelen voor het uitvoeren van de experimenten zoals beschreven

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10800 | | | | |
|------------|---|--|------------|----------------|---|--|
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | | | | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>██████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten</td> </tr> </tbody> </table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | ██████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | | |
| 2 | ██████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten | | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van ██████ als gekweekt onder deel 1 in het onderdrukken van een chronische ontsteking met de nadruk op het therapeutisch effectiviteit. In de literatuur zijn meerdere experimenten beschreven waarin gekeken is naar het effect van ██████ therapie om chronisch ontstekingen voorkomen, maar nog weinig data is beschikbaar over het onderdrukken **tijdens** de ziekte. In dit deel zullen we kijken wat het ideale behandel protocol is van een chronisch ontsteking zoals artritis, met behulp van het proteoglycaan geïnduceerde artritis model^{0.a}: ██████. Dit is een chronisch model waarbij het ziekte verloop intermitterend en relatief mild verloopt, vergelijkbaar als bij de mens. We hebben gekozen voor dit chronische model om juist het effect tijdens chronische ontsteking van ██████ therapie te onderzoeken. ██████

Tevens zullen we in dit model ook het mechanisme onderzoeken met behulp van ██████ muizen specifiek voor het ziekte inducerend antigeen, proteoglycaan. Door zowel de effector ██████ cellen (die de ziekte veroorzaken) als naïeve ██████ cellen te labelen met een zogeheten 'vital dye' kunnen we deze cellen terug vinden in het dieren en met behulp van o.a. FACS analyse bepalen hoe de cellen beïnvloed zijn door de tolDC therapie. Op deze manier kunnen we beoordelen of ██████ ook in vivo ██████ cellen antigeen specifiek kunnen ██████

Om ██████ cellen te induceren zullen we gebruik maken van peptiden die tolerantie kunnen induceren. Hierbij zullen we een proteoglycaan peptide gebruiken, waarvan bekend is dat het ziekte geïnduceerd tegen proteoglycaan kan voorkomen⁸. Maar ook een eerder door ons geïdentificeerd peptide ██████ kan antigeen specifieke regulerende ██████ cellen induceren in het proteoglycaan geïnduceerde artritis muis model onafhankelijk van het ziekte inducerend antigeen ██████. De hypothese is dat dit peptide antigeen specifieke regulerende ██████ cellen induceert tegen verschillende

chronische ontstekingen. Initiële experimenten in transplantatie modellen in de muis laten inderdaad [] cel gemedieerde bescherming zien []).

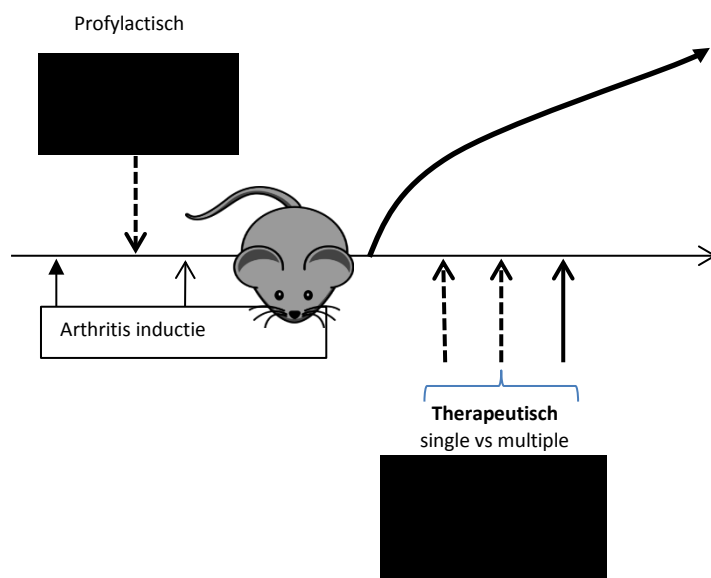
Juist dit aspect van [] therapie in combinatie met een peptide dat antigeen specifieke regulerende [] in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde zijn voor het ontwikkelen van [] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingen modellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking, door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten [] model. In dit wordt gebruik gemaakt van een [] muis waarin [] immuuncellen worden [] om deze muis een [] immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een [] afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.

In deel 2 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

2a: Welke, dosis, frequentie, route, en timing van [] therapie is het meest efficiënt in het onderdrukken van chronisch ziekte. Als referentie zullen we een eenmalige profylactische (voor ziekte inductie) voor de toediening van [] nemen als vergelijking.

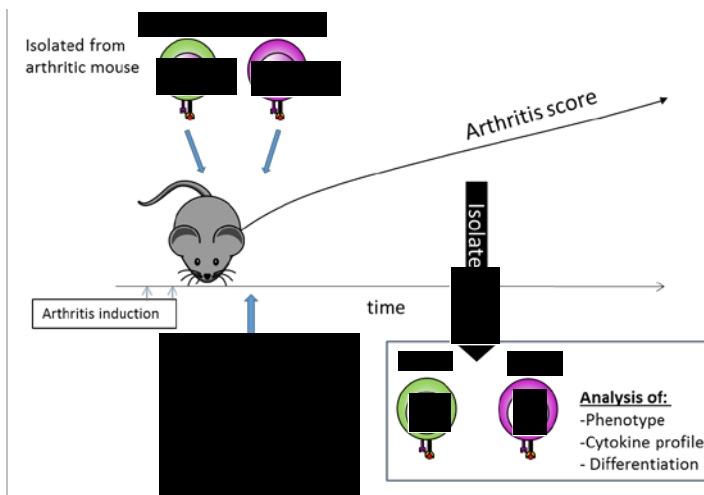
2b: Is [] therapie in staat om in vivo antigeen specifieke [] cellen te induceren en [] cellen te onderdrukken?

2c: werkt [] therapie ook in andere chronisch ontstekingsmodellen?



Figuur 1: [] worden op verschillende tijdstippen en in verschillende doses door gespoten.

Profylactisch zal slechts 1 dosis gekozen worden voordat de dieren ziekte ontwikkelen. Therapeutische toediening bij andere dieren zal starten zodra de eerste ziekte verschijnselen zichtbaar zijn, ongeveer een week na de 2^e immunisatie. Vervolgens zal het effect op artritis verloop worden beoordeeld door de dieren meerdere keren per week te beoordelen op artritis verschijnselen.



Figuur 2: Arthritis wordt geïnduceerd door 2 injecties met humaan proteoglycaan in met adjuvans DDA. Vervolgens worden [redacted] cellen uit verschillende muizen gelabeld met verschillende "Vital Dyes" en door gespoten net als de [redacted]. Door [redacted] cellen door te spuiten kan het effect op [redacted] cellen worden geanalyseerd en de [redacted] cellen geven een beeld van de [redacted] cellen.

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.

- Het artritis model:
- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn [redacted]
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

Dieren die behandeld worden met [redacted] therapie zullen tussen de 1 en maximaal 5 injecties krijgen afhankelijk van welke experimentele groep de dieren zitten . Deze injecties met tussen de [redacted] en [redacted] zullen i.v., i.p., s.c. / [redacted] (zoals bij de mens in de recente fase I trial van [redacted] gegeven worden. Voor profylactische controle behandeling zullen dieren eenmalig ongeveer [redacted] krijgen vlak voor de 2^e immunisatie voor artritis inductie.

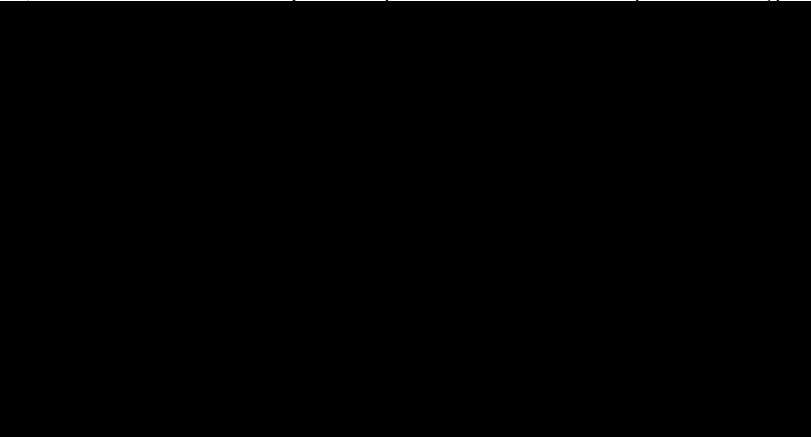
Dieren uit deel 2b waarbij het effect op [redacted] cellen wordt bekeken zullen een dag voor de [redacted] therapie [redacted] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend. In deze experimenten zullen alleen effectieve routes en een eenmalige toediening van [redacted] gebruikt worden.

In het laatste deel zal gekeken worden naar de effectiviteit van [redacted] therapie in andere modellen voor chronische ontsteking. Hierbij zal 1 dosis [redacted] gekozen worden die effectief was in artritis (deel 2a) en met een zo laag mogelijk frequentie van doorspuiten. Ook in de andere modellen van chronische ontsteking zal het ziekte verloop op meerdere dagen per week worden vervolgd (minimaal 2x per week).

De andere modellen voor chronische ontsteking waar mee gewerkt zal worden zijn een gehumaniseerd transplantatie model en atopische dermatitis.

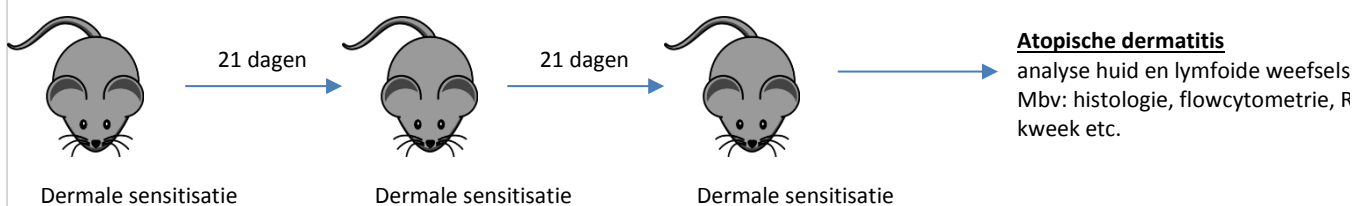
Het [redacted] model wordt uitgevoerd in samenwerking met de universiteit Nijmegen waar het

model ontwikkeld is. In dit model wordt humane huid getransplanteerd op een immunodeficiënte muis onder narcose. Na 3 weken als de graft geaccepteerd is worden humane [] cellen doorgespoten en op dat moment zal ontsteking ontstaan in het transplantaat. Vervolgens zal de therapie worden ingezet door [] door te spuiten (in dit geval natuurlijk []). Deze dieren worden vervolgens regelmatig (tot zelfs dagelijks) beoordeeld op afstoting van de huid. Na 3 weken zal de huid en de lymfoïde organen van de dieren geïsoleerd worden en beoordeeld op ontsteking, infiltraat en [] zoals te meten aan cytokine productie en transcriptie factor gebruik.



Figuur 3: Schematische weergave van het [] model. [] huid wordt onder narcose getransplanteerd op een [] muis. Na 3 weken is de huid graft geaccepteerd en wordt een [] immuunsysteem in de muis gebracht door het inspuiten van allergenen perifere bloed cellen van een bloeddonor. Gedurende 3 weken wordt gekeken naar het ontwikkelen van ontsteking. Na 3 weken worden de graft en de lymfoïde organen geïsoleerd en de huidontsteking en immunerespons geanalyseerd met behulp van flowcytometrie en histologie¹⁵

Het tweede model is een dermatitis model, hiervoor is gekozen omdat het hier een gemengde Th2/Th1 gemedieerde response betreft en bij artritis of transplantatie met name een Th1/Th17 response en dit zal laten zien of [] therapie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 tot 3 dermale sensitisaties met het allergeen in adjuvans met 3 weken tussen tijd. Na afloop wordt de huid geanalyseerd op infiltratie van ontstekingscellen en worden de lymfoïde organen geïsoleerd om de inductie van [] cellen te analyseren tegen het allergeen met o.a. kweek en flowcytometrie¹⁶. De [] therapie zal worden toegediend tussen de 2^e en de 3^e.



Figuur 4: schematische weergave van het dermatitis model. Muizen worden geschoren onder anesthesie en dermaal gesensitiseerd. Sensitisatie wordt 3 maal herhaald met tussenpozen van 3 weken en vervolgens worden huid en lymfoïde organen gesoleerd voor analyse op ontwikkelen van [] celen en huidontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De aannames en vergelijkingen zijn onder **B** nader

toegelicht.

B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdierleveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren van beide sexen gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis¹⁸.

Aantallen deel 2a:

In dit deel willen we maximaal 3 verschillende doses, maximaal 3 verschillende frequenties (1x, 3x of 5x), meerdere routes (maximaal 3) testen als therapeutische mogelijkheden en dat vergelijken met een enkele profylactische dosis. Er is gekozen voor verschillende doses en verschillende frequentie om te kijken of hoger of herhaaldelijk doseren de effectiviteit kan verhogen. In de literatuur zijn meerdere routes beschreven voor het toedienen van celtherapie, het is echter nog niet bekend of het effect van celtherapie afhankelijk is van de route van toedienen.

Hierbij willen we 2 typen [redacted] die in bijlage 1 effectief [redacted] cellen induceerde in vitro testen op effectiviteit om in vivo [redacted] cellen te induceren en chronische ontsteking te onderdrukken.

Om de effectiviteit te bepalen worden [redacted] vergeleken met conventionele immature [redacted] in aan- en afwezigheid van het ziekte inducerend antigeen (proteoglycaan) of een anti-inflammatoir antigeen ([redacted]).

Om tolDCs te matureren en stabiliseren wordt in de literatuur gebruik gemaakt van een non-toxisch [redacted], ter controle zullen de tolDCs ook behandeld worden met dit humaan [redacted] ligand, hiermee beantwoorden we de vraag of dit inderdaad de effectiviteit en stabiliteit in vivo verhoogd..

Groepen:

1. conventionele [redacted] met antigeen
2. conventionele [redacted] zonder antigeen
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] 1 met [redacted] en antigeen
6. [redacted] en antigeen

Per toedieningsroute zullen deze 6 testgroepen met elkaar vergeleken worden. In dit geval is groep 1 de referentie populatie die beschreven is als effectieve profylactische toediening van immature conventionele [redacted] en groep 2 een negatieve controle.

In totaal zijn dit dus $3 \times 3 \times 3 = 27$ therapie verschillende manieren van toedienen voor de 6 test groepen. In de analyse willen we groep 3 statistisch vergelijken met groep 1,2 en 5 en groep 4 met groep 1,2 en 6. Op deze manier analyseren we het effect van 2 [redacted] groepen afzonderlijk en niet direct met elkaar op deze manier zijn minder dieren nodig per analyse. De vergelijking tussen de groepen op basis van effectiviteit om [redacted] cellen te induceren zal in deel 2b bepaald worden.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

In totaal zou dat voor dit deel $11 \times 6 \times 27 = 1782$ acceptor muizen

Aantallen deel 2b:

In dit deel willen we de effectiviteit van de in bijlage 1 geselecteerde [redacted] beoordelen om in vivo

██████████ tijdens ziekte.
Hier kiezen we voor een eenmalige toediening van de ██████████ met zekerheid vast te kunnen stellen. Na transfer van ██████████ cellen zullen maximaal 2 routes van ██████████ worden geanalyseerd en zal de ██████████ injectie op maximaal 3 verschillende tijdstippen gegeven worden. De keuze voor de routes zal gemaakt worden op basis van de resultaten uit deel 2a, hierbij zullen 2 effectieve routes geselecteerd worden. De verschillende tijdstippen zijn om te kijken of ██████████ wanneer deze vroeg in het ziekte verloop wordt gegeven ten opzichte van op latere tijdstippen. Het is de hypothese dat vroeg behandelen van patiënten net na ontwikkelen van de ziekte effectiever is dan later, deze hypothese kunnen we in dit experiment testen.
De derde vraag die we in dit deel willen beantwoorden is of een ziekte inducerend antigeen vergelijkbare ██████████ en we zullen deze direct met elkaar vergelijken.

Test groepen:

1. Conventionele ██████████ met antigeen 1
2. Conventionele ██████████ met antigeen 2
3. conventionele ██████████ zonder antigeen (negatieve controle)
4. ██████████ 1 met antigeen 1
5. ██████████ 1 met antigeen 2
6. ██████████ 2 met antigeen 1
7. ██████████ met antigeen 2
8. ██████████ met ██████████ en antigeen
9. ██████████ met ██████████ en antigeen

In totaal hebben we hier dus 9 testgroepen, waarbij we 2 routes vergelijken en 3 tijdstippen van ██████████ therapie. Voor het bepalen van de groepsgrootte gelden dezelfde aannames als in het vorige deel, met als verschil dat we in dit experiment meerdere vergelijkingen hebben. Hier willen we zowel de ██████████ als de ██████████ met elkaar vergelijken en betreft het 5 vergelijkingen, bijvoorbeeld groep 4 vergelijken we met groep 1,3,5,6 en 8. En groep 6 vergelijken we met groep 2,3,4,7 en 9.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in arthritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 5 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.01 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.
Dit geeft dus $12 \cdot 9 \cdot 2 \cdot 3 = 648$ acceptor dieren

Deze dieren ontvangen ook ██████████ therapie. Hiervoor zullen we ██████████ muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer ██████████ cellen geïsoleerd kunnen worden. Dus om ██████████ cellen te kunnen doorspuiten hebben we 2 donor muizen nog. Dit geeft dus $648 \cdot 2 = 1296$ donor dieren die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Aantallen voor deel 2c:

In dit deel willen we aantonen dat ██████████ therapie ook effectief is in andere chronische ontstekingen waar een ander type ontsteking aan ten grondslag ligt. In dit geval is gekozen voor een atopische dermatitis model omdat dit een meer Th2/Th1 type ontsteking is en arthritis een Th17/Th1 type.

Groepen:

1. Conventionele ██████████ met antigeen
2. conventionele ██████████ zonder antigeen
3. ██████████ met antigeen
4. ██████████ met antigeen
5. ██████████ 1 met ██████████ en antigeen
6. ██████████ 2 ██████████ en antigeen

In dit deel zullen we slechts 2 therapie schema's testen die effectief [redacted] in het artritis model. In het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) in ziekte score van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 8 dieren nodig hebben.

In totaal betreft het dan $8 \times 6 \times 2 = 96$ dieren

Om een translationele stap te kunnen maken is het essentieel om aan te tonen dat [redacted] therapie ook in het humane immuunsysteem in staat is [redacted] cellen te induceren. Hiertoe willen we gebruik maken van een muis transplantatie model, waarbij in immuundeficiënte muizen humane immuun cellen worden ingespoten samen met de [redacted] injectie.

Voor het humane transplantatie model is bekend dat de variatie rond de 20% ligt, de power wordt gesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen en het at te tonen verschil houden we op 50%. Bij een alfa van 0.017 door de bonferoni correctie, geeft dit een groeps grootte van 7 dieren per groep.

Groepen:

1. Conventionele [redacted] met antigeen
2. Geen celtherapie
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] met [redacted] en antigeen
6. [redacted] 2 [redacted] en antigeen

In deze proeven willen we de therapie van [redacted] vergelijken met ongeladen DCs en een negatieve controle groep zonder therapie.

Omdat het hier experimenten betreft die afhankelijk zijn van humane donoren speelt ook donor variatie mee in de uitkomst van het experiment. Om eventuele donor variatie te kunnen beoordelen zal het experiment 3 maal uitgevoerd worden met 3 afzonderlijke donoren.

In totaal betreft het dan $6 \times 7 \times 3 = 126$ muizen

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 1296

Artritis dieren: $1782 + 648 = 2430$

Overige ontstekingsmodellen: $96 + 126 = 222$

Totaal: **3948**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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.

De vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [REDACTED] in vivo [REDACTED] regulatoire [REDACTED] cellen [REDACTED]? Kunnen deze Tregs artritis onderdrukken? Wat is de meest effectieve therapie voor wat betreft dosering, frequentie van toediening of de timing tijdens het ziekte verloop voor een [REDACTED] therapie? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

In het laatste deel wordt alleen gekeken naar het effect van op dat moment reeds bewezen therapeutisch toepassing van [REDACTED] in diermodellen voor chronische ontsteking waarmee ervaring is op gedaan door partners waarmee direct wordt samengewerkt of ervaring mee is binnen de eigen onderzoeksgroep.

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.

Alle dieren worden minimaal één keer in de week gecontroleerd zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. De muizen waarbij artritis geïnduceerd is krijgen extra voer in de kooi zodat deze muizen niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Bij de andere muizen is de standaard 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.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immunoreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

In het geval van het transplantatie model zal het transplanteren van de huid onder algehele anaesthesie plaatsvinden met passende analgesie.
In het dermatitis model zullen de dieren onder gas anesthesie worden geschoren en gesensitiseerd.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis en transplantatie reactie zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het transplantatie model wordt als huumaan eindpunt necrose ten gevolge van afstoting van het transplantaat aangehouden.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt. Het dermatitis model is een progressief model en bij het ontwikkelen van jeuk zal deze niet verdwijnen, om de ontwikkeling van

mogelijke secundaire infecties ten gevolge van krablaesies aan de huid te voorkomen beschouwen we de ontwikkeling van chronische jeuk als HEP.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt.

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

In het geval van artritis en transplantatie is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

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.

Donor dieren: licht ongerief

Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting gaan we ervan uit dat slechts de helft van de therapie effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot maximaal matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Transplantatie model: 40% licht ongerief en 60% tot matig ongerief

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.

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

10800

Vul de naam van de instelling of organisatie in.

Universiteit Utrecht

Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer

Type dierproef

3

Ontwikkelen van een [redacted] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten.

Gebruik de volgnummers

1 Algemene gegevens

1.1

1.2

1.3

van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van een therapeutisch vaccin bij chronische ziekten. In dit deel zullen de initiële experimenten ook weer gedaan worden in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model waarmee veel ervaring is (een typisch Th17/Th1 model) en zal in het vervolg ook gekeken worden naar de effectiviteit van een dergelijk [redacted] vaccin in een model voor dermatitis (een typisch Th2/Th1 model).

Om [redacted] cellen te induceren zijn verschillende methoden beschreven in de literatuur. Zo is het mucosaal immuunsysteem bekend om zijn [redacted] capaciteit in een profylactische setting. Recent zijn er meerdere aanwijzingen in de literatuur beschreven dat ook dermale toediening een goede

route is om [redacted] cellen te krijgen. In dit deel van het project willen we ons voornamelijk richten op of we via de meest veelbelovende routes [redacted] [redacted] cellen kunnen induceren tijdens de aanwezigheid van een ontsteking, zoals bijvoorbeeld artritis of dermatitis. Door gebruik te maken van een [redacted] cel transfer model kunnen we het effect van de vaccinatie op [redacted] differentiatie in detail volgen. Daarnaast zullen we gebruik [redacted] Dit [redacted]

In deel 3 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

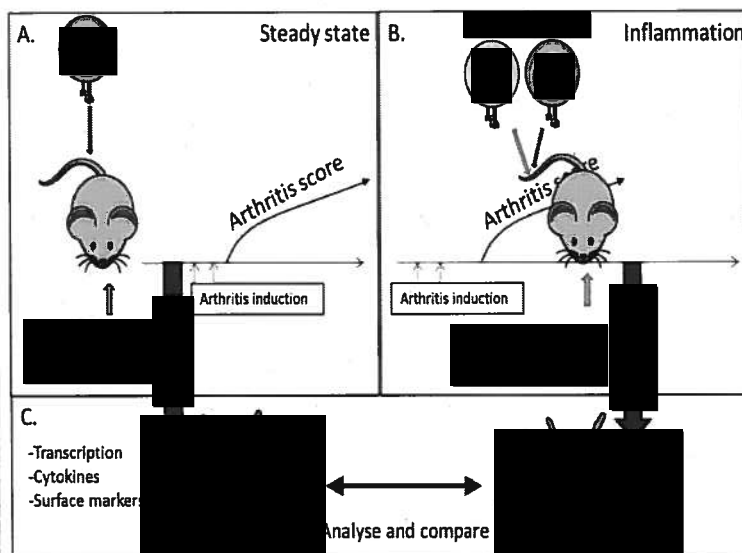
3a: is het mogelijk een chronische ontsteking te onderdrukken met een [redacted] [redacted] Om deze vraag te beantwoorden zullen we verschillende adjuvantia testen. In ieder geval zullen we verschillende [redacted] onderzoeken omdat we eerder hebben aangetoond dat bijvoorbeeld PLGA nano-partikles tolerogene markers opreguleren in vitro in [redacted]. Maar ook [redacted] liganden en [redacted] liganden worden in de literatuur aangewezen als potentiële [redacted]

adjuvantia¹⁴.

Om het effect van de [redacted] vaccinatie in vivo te beoordelen zullen we hierbij gebruik maken van adoptieve transfer modellen waarin we [redacted] cellen gelabeld met een vita dye doorspuiten en aan het eind van het experiment hun differentiatie en lokalisatie de muis kunnen beoordelen met behulp van FACS analyse.

De dieren zullen voor het ontwikkelen van ziekte gevaccineerd worden om de steady state vaccinatie te beoordelen en na induceren van de ziekte (na de laatste immunisatie) om de therapeutische effectiviteit vast te stellen.

3b. De andere belangrijke vraag die wil in dit deel van het project willen beantwoorden is wat is er anders is [redacted] In veel modellen is het goed mogelijk een [redacted] vaccinatie toe te passen door bijvoorbeeld gebruik te maken van [redacted] inductie. Echter tijdens ontsteking is dit veel minder effectief. Om deze verschillen in kaart te brengen willen we kijken welke [redacted] een rol spelen tijdens [redacted] inductie door een [redacted] vaccinatie te geven in conditionele knock-out muizen waarin we specifieke [redacted] kunnen uitschakelen met behulp van [redacted] Daarnaast zullen we [redacted] isoleren na vaccinatie uit de drainerende lymfeknopen en deze vergelijken tussen dieren met een chronische ziekte en dieren zonder een chronische ontstekingsziekte.



Figuur 1:

Therapeutische en profylactische vaccinatie wordt vergeleken met de focus op [redacted] en [redacted] vaccinatie routes. Hierbij wordt het type [redacted] dat betrokken is bij de inductie in kaart gebracht met behulp van specifiek transgene muizen, maar ook door [redacted] te isoleren uit de drainerende lymfeklieren.

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.

- **Het artritis model:**

- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn¹⁸.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.
- Dieren waarbij het effect op T-cellen wordt bekeken zullen een minimaal dag voor toediening van het vaccin T-cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend.
- T-cellen vaccinatie met ziekte inducerend antigeen (proteoglycaan) of in aanwezigheid van een tolerogeen adjuvant zal voor of na de 2^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.
- Het tweede model is een **dermatitis model**, hiervoor is gekozen omdat het hier een voornamelijk Th2 gemedieerde response betreft anders dan bij artritis dit zal laten zien of vaccinatie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 of 3 sensitisatie met allergeen met 3 weken tussen tijd gevolgd door een challenge op de huid. De sensitisatie wordt of afhankelijk van het antigeen. Vervolgens worden de dieren gechallenged en wordt de ontwikkeling van huidontsteking op de plek van de challenge visueel beoordeeld. Alle dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden om de immuun relevante organen te isoleren voor verdere analyse in het laboratorium.
- T-cellen vaccinatie met ziekte inducerend antigeen of eiwit in aanwezigheid van een adjuvant zal voor of na de 2^e/3^e vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De exacte afwegingen en statistische berekeningen zijn hieronder verder uitgewerkt.

B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes. In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdier leveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis. In het geval van dermatitis is er geen geslachtsvoorkeur voor de dieren.

Aantallen deel 2a:

In totaal kunnen naar verwachting maximaal 10 verschillende adjuvantia testen. Enkele voorbeelden zijn PLGA partikels (mogelijk geladen met , anti-inflammatoire compounds als , liposomale formuleringen, anti-lichaam gemedieerde targeting van . Hierbij willen we gebruik maken van 2 peptiden. Ten eerste het aangetoond dat het regulerende T cellen kan induceren in artritis en een tweede ziekte relevant peptide (bijvoorbeeld proteoglycaan peptide in artritis of ovalbumine in dermatitis). Om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen we maximaal 3 verschillende doseringen testen per verschillend adjuvans. Het aantal doseringen is afhankelijk van de formulering van het vaccin en de concentratie peptide die hierin beschikbaar is voor het immuunsysteem en meetbare cel activatie geeft van de ingespoten cellen.

Per experiment hebben we een positieve controle nodig met een bekend stof

(bijvoorbeeld dexamethason) en een onbehandelde negatieve controle en kunnen we in totaal 5 testgroepen analyseren (met 2 controles erbij zijn dat 7 groepen per experiment).

Groepen:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2; negatieve controle
- Groep 3: test vaccin 1 dosis 1
- Groep 4: test vaccin 1 dosis 2
- Groep 5: test vaccin 1 dosis 3

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen* 12 dieren= **600** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de [redacted] cel response willen vervolgd hebben maximaal **1200** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende [redacted] cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Dermatitis model:

Voor het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins * 5 groepen* 9 dieren= **450** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de [redacted] cel response willen vervolgd hebben maximaal **900** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende [redacted] cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

Aantallen deel 3b:

In deel 3b zullen we ons richten op de [redacted] cel. In dit deel zullen we [redacted] isoleren uit dieren die een chronische ontsteking en controle dieren kort na vaccinatie om de verschillen tussen deze [redacted] in kaart te brengen. In deze vraagstelling is het niet noodzakelijk om verschillende diermodellen met verschillende ontstekingen te testen en beperken we ons tot het artritis model.

Hier willen we 2 effectieve vaccins testen (getest in 3a) via beide routes [redacted]. Hierbij zullen de lymfeknopen geïsoleerd worden op 3 tijdstippen na vaccinatie om te analyseren of de [redacted] veranderen over tijd na vaccinatie.

Groepen per experiment:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2: negatieve controle
- Groep 3: vaccin1 [redacted]
- Groep 4: vaccin 1 [redacted]

Artritis model:

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 3 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.017. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de

proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

- Dit zijn dus **44** dieren per experiment.
- Per vaccin wordt dit experiment **6** maal uitgevoerd, namelijk de dieren worden op 3 tijdstippen na vaccinatie geanalyseerd en zowel tijdens steady state als tijdens een ontsteking.
- We willen 2 succesvolle (in 3a) vaccinaties testen

In totaal dus 2 vaccins * 6 experimenten * 44 dieren = **528** muizen).

En tevens zullen we 2 effectieve vaccin routes [redacted] en 2 effectieve formuleringen (bewezen in 3a) testen, samen met de juiste positieve (immunosuppressivum) als negatieve (ongevaccineerde) controle in zowel conventionele als conditionele knock-out muizen (2 stammen). In totaal zijn dit dus 6 groepen per stam dus 18 groepen van 12 dieren in totaal **216** dieren

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 2100

Artritis/dermatitis met vaccinatie: 600+450+528+216=1794

Totaal: **3894**

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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.

De vraagstelling vereist de bestudering van de immunorespons in vivo, namelijk kunnen [redacted] in vivo [redacted] regulatoire [redacted] cellen ([redacted] [redacted]) kunnen deze Tregs artritis onderdrukken? Via welke route is het mogelijk therapeutisch te vaccineren voor regulerende T cellen en in aanwezigheid van welke tolerogene adjuvans? Vanwege de complexiteit van de immunorespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

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.

Voor muizen waarbij artritis geïnduceerd is wordt er extra op gelet dat deze muizen extra voer in de kooi hebben liggen zodat ze niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Verder worden de muizen regelmatig gecheckt zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

Voor het dermatitis model is net als bij donor muizen sprake van standaard kooiverrijking, daarnaast zullen de dieren vanaf challenge wanneer ziekteverschijnselen kunnen verschijnen zeer regelmatig gecheckt worden om ongerief tot een minimum te beperken.

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.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden¹⁹. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

Scheren en sensibiliseren van de dieren voor dermatitis zal onder anaesthesie plaatsvinden

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het ontwikkelen van dermatitis zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het 1. ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.

2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.

2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen.

Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt..

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

In het geval van artritis is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

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.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

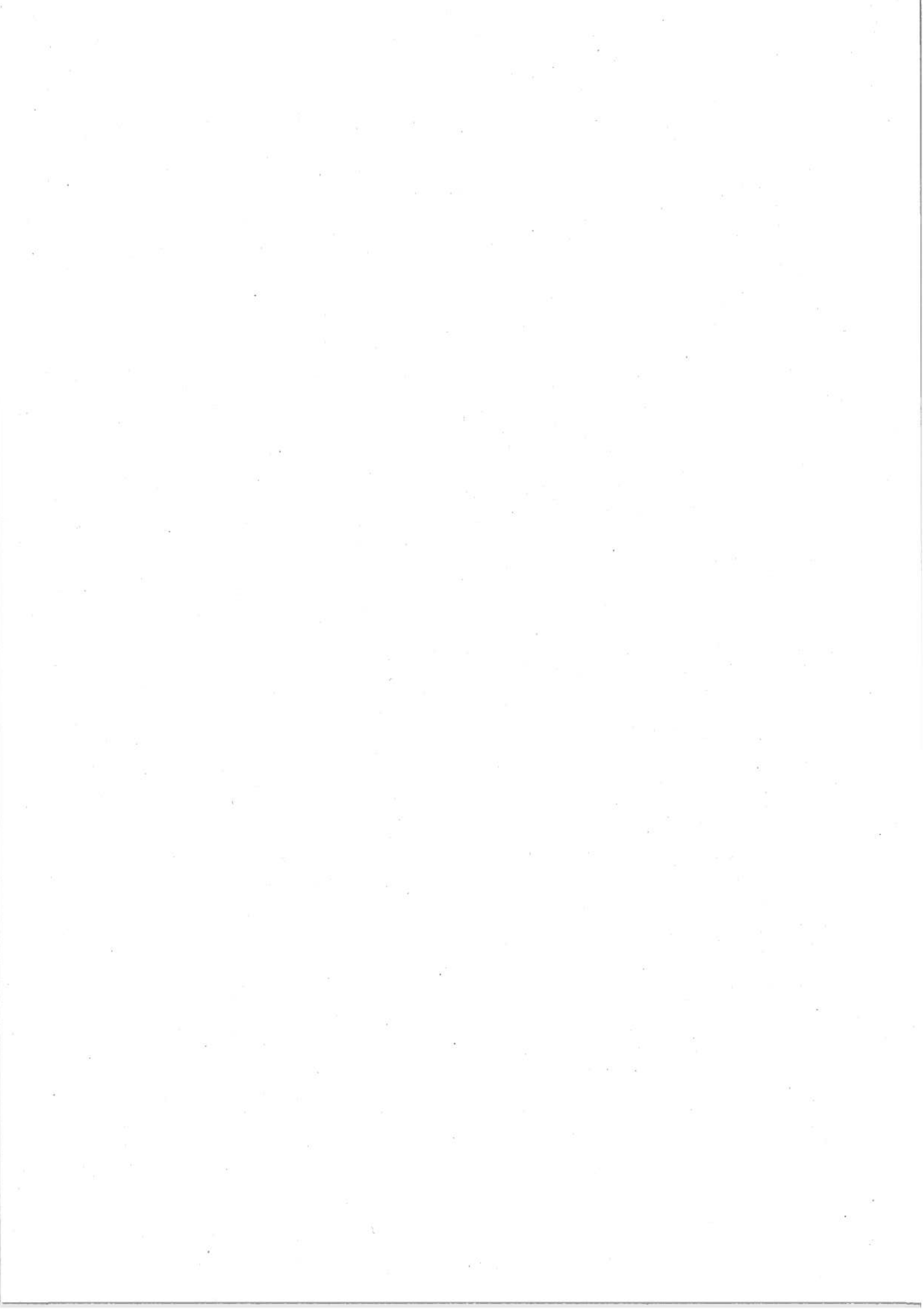
Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002016467

Bijlagen

1

28 APR. 2016

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft naar aanleiding van door ons gestelde vragen uw NTS aangepast en uw aanvraag verhelderd op het gebied van aantallen dieren, te gebruiken geslachten, verfijning van dierproeven en hergebruik van dieren. De vragen zijn afdoende beantwoord.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De specifieke voorwaarde is gesteld omdat de CCD het van belang acht dat beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt zullen worden om het aantal in voorraad gedode dieren te verminderen.

De algemene voorwaarde betreffende de afstemming met de IVD is gesteld om onnodig gebruik van dieren in experimenten te voorkomen. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2016 tot en met 30 april 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar heeft.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 maart 2016. 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. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met toevoeging van enkele algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

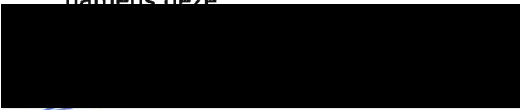
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma
plv Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 mei 2016 tot en met 30 april 2021, voor het project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 maart 2016, ontvangen op 15 maart 2016.
 - d Uw aanvullingen zoals ontvangen op 19 april 2016.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|--|---------------|------------------------------|---|
| In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie | Muizen (Mus musculus) / WT en [REDACTED] | 780 | 100% Licht | 630 WT, 150 transgenen |
| [REDACTED] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Artritis | Muizen (Mus musculus) / | 3726 | 49% Matig 51% Licht | 1296 donordieren 2430 artritisdieren |
| [REDACTED] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_dermatitis | Muizen (Mus musculus) / | 96 | 44% Matig 56% Licht | |
| [REDACTED] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Transplantatie model | Muizen (Mus musculus) / | 126 | 60% Matig 40% Licht | |
| Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Artritis model | Muizen (Mus musculus) / | 2544 | 40% Matig 60% Licht | 1200 donordieren 1344 artritisdieren |
| Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten)_dermatitis | Muizen (Mus musculus) / | 1350 | 15% Matig 85% Licht | 900 donordieren 450 dermatitisdieren |

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

Specifieke voorwaarden:

- Voor de experimenten beschreven in bijlage 1 (In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie) zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden, de IvD houdt hier toezicht op bij de werkprotocollen van de individuele experimenten zodat aan het einde van de looptijd van het

project de geslachtsverhouding op 50/50 uitkomt. Wanneer na het uitvoeren van meerdere / een aantal individuele experimenten gedurende een periode van 2 jaar blijkt dat hier niet aan kan worden voldaan (omdat levering van de geslachten afhankelijk is van de leverancier), zal dit gemeld worden aan de CCD, zodat zij deze voorwaarde mogelijk kunnen herzien of intrekken.

- In bijlage 2 heeft u niet aangegeven of de dieren die hergebruikt worden wel/niet eerder ernstig ongerief hebben ondervonden. Aangezien dit wettelijk vereist is, gaan wij ervan uit dat u hier rekening mee houdt bij de uitvoer van uw experimenten.

Algemene voorwaarden:

- De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

- In artikel 10, lid 1a van de wet, 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.



14 APR. 2016

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl, 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 | 11400 |
| | | <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 | Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 64156338 |
| 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 | de Boelelaan 1117 |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 1081HV Amsterdam |
| | | IBAN | |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Afdeling crediteuren VU Medisch Centrum |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] X 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. | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] X 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 | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | |
| Afdeling | |
| Telefoonnummer | |
| E-mailadres | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|-------------|
| Startdatum | 1 - 6- 2016 |
| Einddatum | 1 - 6- 2019 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres | Amsterdam Nederland |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur. **Er blijkt dat bij de factuur een inkoopordernummer (geplaatst op de factuur) vermeld dient te worden. het inkoopordernummer is 4573361**
 Zonder het nummer kan de crediteurenadministratie van het VUmc de betaling helaas niet in behandeling nemen. Alvast bedankt.

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.

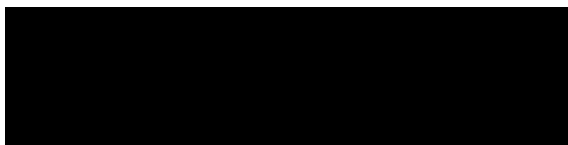
| | |
|--------------|-----------|
| Naam | |
| Functie | |
| Plaats | Amsterdam |
| Datum | // |
| Handtekening | |

Beste Centrale Commissie dierproeven,

Er blijkt dat bij de factuur een inkoopordernummer vermeld dient te worden (geplaatst op de factuur). Het inkoopordernummer is **4573361**. Graag zouden wij u willen vragen om dit nummer toe te voegen bij de factuur. Zonder het nummer kan de crediteurenadministratie van het VUmc de betaling helaas niet in behandeling nemen.

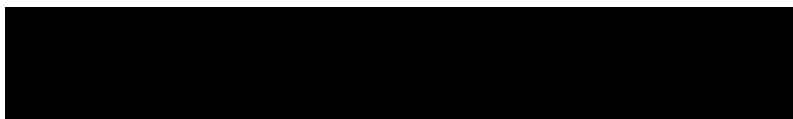
Alvast bedankt.

Met vriendelijke groet,



VRJE
UNIVERSITEIT
AMSTERDAM

HRM, Arbo
& Milieu





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.
- 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.

Myocarditis is een ontstekingsziekte van het myocard (= hartspier). In de meeste gevallen wordt myocarditis veroorzaakt door een virale infectie danwel een auto-immuun respons tegen eiwitten van het myocard. Beide vormen zijn aan elkaar gerelateerd, maar verschillen in pathofysiologie. Een veel voorkomende complicatie bij myocarditis patiënten is het ontstaan van atrium (= boezem) fibrilleren (= hartritmestoornis). Dit kan grote gevolgen hebben voor de patiënt, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte.

Atriale ontsteking is een bekende onderliggende oorzaak van atriumfibrilleren, en we hebben onlangs aangetoond dat patiënten met myocarditis significant meer ontstekingscellen in de atria hebben dan patiënten zonder myocarditis. Atriumfibrilleren is moeilijk te behandelen, en huidige therapieën zijn er op gericht om de gevolgen van atriumfibrilleren te beperken. Vanuit klinisch oogpunt zou het daarom erg waardevol zijn om bij patiënten met een predispositie voor atriumfibrilleren (zoals bij een ontsteking in het atrium) dit vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen, om hierdoor de incidentie van atriumfibrilleren bij myocarditis te verlagen. Hoewel er algemene biomarkers zijn die ontsteking kunnen aantonen in het bloed, kunnen deze niet specifiek aan de atria worden gekoppeld en zijn dus niet bruikbaar voor het specifiek diagnosticeren van atriale ontsteking. Hierdoor zijn er nieuwe biomarkers nodig, die wel specifiek zijn voor ontsteking in de atria.

Dit project heeft daarom als doel het vinden van biomarkers waarmee atriale ontsteking kan worden gediagnosticeerd in myocarditis.

Voor dit onderzoek is het noodzakelijk om gebruik te maken van dierexperimenteel onderzoek. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren met bloed van myocarditis patiënten omdat we van deze patiënten geen atriaal hartweefsel kunnen afnemen, wat nodig is om te bewijzen dat de biomarker verhoogd tot expressie komt bij ontsteking in de atria.

In dit project gaan wij hiervoor gebruik maken van twee modellen van de meest frequent voorkomende vormen van myocarditis bij patiënten: autoimmuun myocarditis en acute virale myocarditis. Myocarditis is een brede ziekte is met meerdere onderliggende mechanismen (bij de meeste myocarditis patiënten is myocarditis de oorzaak van óf een acute virale infectie, óf een autoimmuunrespons) en uiteenlopende klinische symptomen. Het toepassen van beide modellen is noodzakelijk, omdat we van potentieel interessante biomarkers voor atriale ontsteking willen weten of deze extrapoleerbaar zijn niet alleen naar patiënten met autoimmuun myocarditis, maar ook naar patiënten met een acute virale myocarditis.

Voor de eerste vorm maken wij gebruik van een rat model van experimentele autoimmuun myocarditis (EAM). Dit is een goed beschreven model dat wereldwijd gebruikt wordt.

Voor acute virale myocarditis zijn er geen geschikte rat-modellen. Hiervoor maken wij gebruik van een muismodel van acute coxsackievirus B3-geïnduceerde myocarditis. Dit model wordt wereldwijd als dusdanig gebruikt, en hiermee hebben wij zelf ook ervaring.

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?

Dit onderzoeksproject heeft het volgende doel:

Het vinden van diagnostische biomarkers in het bloed, die specifiek zijn voor ontsteking in de atria.

Het muis-model voor acute virale myocarditis is een goedlopend model waar wij zelf al veel ervaring hebben. We hebben zelf het rat-model voor EAM nog niet eerder gebruikt, maar we hebben nauw contact met een andere onderzoeksgroep die ervaring heeft met dit model. We verwachten derhalve niet dat het toepassen van het rat-model bij ons veel problemen zal opleveren. Voor de analyses die wij willen

uitvoeren is alle benodigde apparatuur en expertise aanwezig op onze afdeling. We hebben al een onderzoeks-beurs binnengehaald voor dit project, dus ook op financieel gebied verwachten we dat dit project haalbaar is.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang:

Er is weinig bekend van het effect dat myocarditis precies heeft op de atria. Door de analyses die wij gaan uitvoeren krijgen we een beter overzicht van de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking. Dit is belangrijk om de fundamentele kennis met betrekking tot ontsteking in het hart te vergroten.

Maatschappelijk belang:

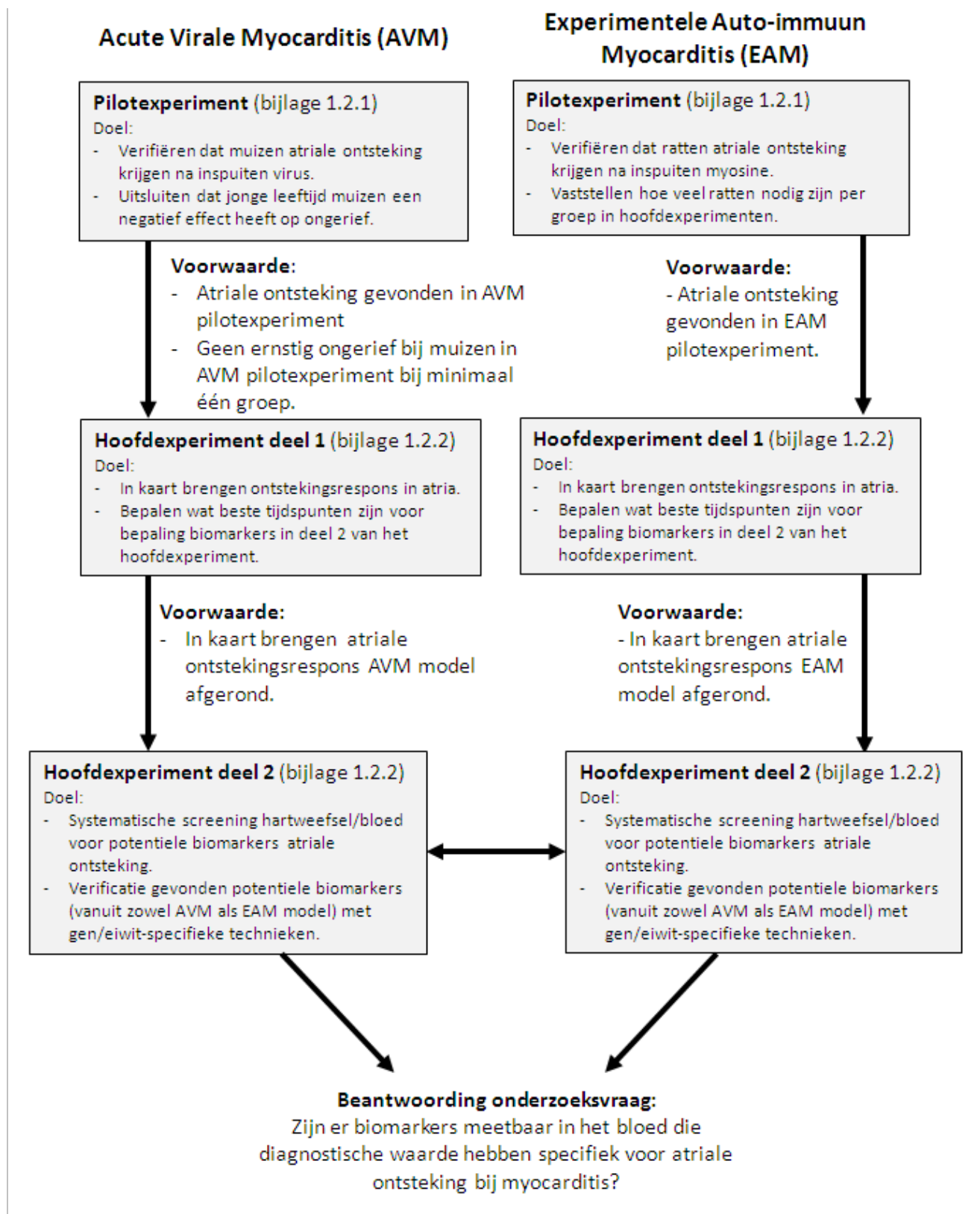
Atriumfibrilleren is een chronische aandoening. In een vroege fase kan atriumfibrilleren behandeld worden met medicatie, maar naarmate de aandoening verergert (permanente atriumfibrilleren) kan het niet meer met medicatie worden behandeld, en kan atriumfibrilleren tot ernstige complicaties leiden zoals hartfalen, beroerte of plotselinge hartdood. Atriumfibrilleren komt voor bij circa 2% van de bevolking, en de incidentie groeit jaarlijks. Myocarditis is een van de hartaandoeningen die kan leiden tot atriumfibrilleren. Een belangrijk gegeven is dat myocarditis, in tegenstelling tot andere hart- en vaatziekten, ook veel bij jonge mensen voorkomt.

Deze studie zal bijdragen aan de ontwikkeling van diagnostische biomarkers om atriale ontsteking in myocarditis patiënten te identificeren. Hiermee kan een predispositie voor atriumfibrilleren worden opgespoord en daarna behandeld worden. Dit zal er uiteindelijk toe doen leiden dat de incidentie van atriumfibrilleren en de daaraan gerelateerde morbiditeit en mortaliteit omlaag gaat.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

The studie heeft de volgende opzet:



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

Pilotexperiment:

In een pilotexperiment wordt beoordeeld of het induceren van acute virale myocarditis en EAM in respectievelijk muizen en ratten resulteert in ontsteking in de atria. Bij het acute virale myocarditis model maken we gebruik van jongere muizen (4 en 5 weken oud) dan we in het verleden hebben gebruikt (6 weken oud). De reden hiervoor is dat jongere muizen gevoeliger zijn voor het ingespoten virus, wat de kans groter maakt dat de muizen ontsteking in de atria ontwikkelen. We moeten dan ook hier controleren of deze extra gevoeligheid niet resulteert in ernstig ongerief.

Omdat wij zelf nog geen ervaring hebben met het EAM model willen wij, in samenwerking met een groep die ervaring heeft met het EAM model, in dit pilotexperiment ook het model hier operationeel maken. Onderzoeken of EAM resulteert in ontsteking in de atria gebeurt in dezelfde ratten. Op basis van deze pilot willen we inschatten hoe groot de groepsgroottes moeten worden bij de hoofdexperimenten (i.v.m. EAM-gerelateerde uitval van ratten)

Hoofdexperiment:

In deel 1 het hoofdexperiment gaan we eerst voor beide modellen op verschillende tijdstippen na het induceren van acute virale myocarditis / EAM de mate van ontsteking en remodeling bepalen in de atria. Met deze informatie kunnen wij een overzicht en tijdslijn maken van de ontstekingsrespons in de atria. Het eerst in kaart brengen van deze ontstekingsresponsen is essentieel voor de voortgang van het project, omdat we zonder deze informatie niet weten we op welke tijdstippen we mee moeten nemen voor de biomarker-analyses.

Op het tijdstip dat we de meeste ontsteking vinden (dit tijdstip wordt per model apart bepaald), wordt er in deel 2 van het hoofdexperiment voor beide modellen een systematische analyse gedaan (bijvoorbeeld een RNAseq of proteomics analyse). Deze analyse wordt op nieuwe groepen dieren uitgevoerd omdat we de complete harten ingevroren nodig hebben voor deze analyses, terwijl voor het in kaart brengen van de ontstekingsrespons in deel 1 van het hoofdexperiment het nodig is dat de atria zijn gefixeerd in formaldehyde. Het doel van deze analyse is om potentieel interessante genen/eiwitten te vinden die specifiek tot expressie komen bij atriale ontsteking en hierdoor van diagnostische waarde zijn voor atriale ontsteking. Deze potentiële biomarkers worden vervolgens verder onderzocht met analyses specifiek gericht op individuele genen/eiwitten (bijvoorbeeld een qPCR of ELISA) in zowel het model voor EAM als het model voor acute virale myocarditis. Voor elk model voeren we deze specifieke analyses uit voor potentiële genen/eiwitten afkomstig vanuit de systematische analyses van beide modellen. Hierdoor krijgen we een goed beeld in hoeverre potentiële biomarkers extrapoleerbaar zijn naar patiënten met verschillende vormen van myocarditis (acute virale myocarditis of EAM). Voor deze specifieke analyse is ook ingevroren hartweefsel nodig.

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 studie begint met het uitvoeren van het pilotexperiment voor beide modellen. De samenhang van de componenten en de voorwaarden die op verschillende punten in de studie nodig zijn om verder te gaan naar het volgende onderdeel staan weergegeven in het schema van 3.4.1.

Er zitten in totaal vier keuzemomenten/voorwaarden in de opzet van de studie:

- Om met het hoofdexperiment te beginnen van het EAM model, moet er eerst in het pilotexperiment van het EAM model worden aangetoond dat in dit model atriale ontsteking plaats vindt.
 - Om met het hoofdexperiment te beginnen van het acute virale myocarditis model, moet er eerst in het pilotexperiment van het acute virale myocarditis model worden aangetoond dat in dit model atriale ontsteking plaats vindt. Ook moet deze atriale ontsteking induceerbaar zijn zonder ernstig ongerief te veroorzaken voor de muizen.
 - Voor beide modellen kan er pas gestart worden met deel 2 van het hoofdexperiment als het in kaart
-

brengen van de ontstekingsrespons in de atria is afgerond in deel 1 van het hoofdexperiment.

Gezamenlijk kunnen deze experimenten de onderzoeksvraag 'Zijn er biomarkers meetbaar in het bloed die diagnostische waarde hebben specifiek voor atriale ontsteking bij myocarditis?' beantwoorden. Het gebruik van beide modellen is hiervoor essentieel omdat we alleen met beide modellen een compleet beeld kunnen krijgen in hoeverre de gevonden biomarkers in deze studie extrapoleerbaar zijn naar de totale myocarditis patiëntenpopulatie.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--|
| 1 | Pilotexperiment |
| 2 | Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | | |
|-----|--|--------------------|-----------------|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 11400 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | VU medisch centrum | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 1 | Pilotexperiment |

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.

Het pilotexperiment wordt voor beide myocarditis-modellen (acute virale myocarditis en EAM) uitgevoerd.

Acute virale myocarditis. Het is bekend dat coxsackievirus B3 infectie bij muizen kan zorgen voor ontsteking in de atria. Ook is bekend dat muizen gevoeliger zijn voor coxsackievirus B3 infectie als ze jonger zijn. In het verleden hebben wij experimenten uitgevoerd met dit model, waarbij we muizen van 6 weken oud gebruikten. Deze muizen zijn echter te oud om atriale ontsteking te krijgen. In dit pilotexperiment injecteren we twee groepen jongere muizen (4 weken oud en 5 weken oud) met dit virus. Hierbij kijken we of de jongere muizen atriale ontsteking ontwikkelen, en of er een verschil is in de hoeveelheid ontsteking in de atria tussen de twee leeftijden. Ook bestaat er een kleine kans dat de grotere gevoeligheid voor het virus (bij 4 weken oud) ook een negatief effect heeft op het ziekteverloop van de muizen. Dit willen wij uitsluiten voordat we verder gaan met het hoofdexperiment.

Primaire uitkomstparameters:

- *Hoeveelheid ontsteking in atria.* Dit wordt gemeten aan de hand van de hoeveelheid ontstekingscellen in de atria. Dit vergelijken we met atria van ongeïnfecteerde muizen uit voorgaande experimenten.
- *Ongerief van de muizen.* Hierbij wordt gelet op uiterlijke kenmerken van ongerief (pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en afname in gewicht van de muis, wat we bepalen met een weegschaal.

Indien de jongere muizen atriale ontsteking ontwikkelen en dit niet zorgt voor ernstig ongerief, dan kan voor het acute virale myocarditis model worden overgegaan naar het hoofdexperiment.

Experimentele Auto-immuun Myocarditis.

Vanuit literatuur is al bekend dat ratten na inductie van EAM ontsteking in de atria kunnen ontwikkelen. Voor EAM heeft het pilotexperiment twee doelen. Ten eerste willen we vast stellen of wij, in samenwerking met een groep die ervaring heeft met dit model, EAM kunnen induceren bij ratten, evenals of bij deze ratten atriale ontsteking ontstaat wanneer wij EAM induceren.

Ook willen wij in dit pilotexperiment bepalen of de verwachte uitval (20% uitval tussen dag 18 en 21 na inductie EAM, gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen) ook van toepassing is als wij de EAM induceren. Deze bepaling is essentieel, aangezien we voor de hoofexperimenten ook groepen ratten nodig hebben waarbij de atriale ontsteking al voorbij is, wat betekent dat deze ratten langer dan 21 dagen in de proef moeten blijven.

Primaire uitkomstparameters:

- *Hoeveelheid ontsteking in atria.* Dit wordt gemeten aan de hand van de hoeveelheid ontstekingscellen in de atria. Dit vergelijken we met atria van controle ratten uit voorgaande experimenten (met andere modellen).
- *Ongerief en uitval van de ratten.* Hierbij wordt gelet op uiterlijke kenmerken van ongerief (pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en afname in gewicht van de rat, wat we bepalen met een weegschaal. Onder 'uitval' wordt het percentage van de dieren verstaan dat door het bereiken van een humaan eindpunt uit de proef wordt gehaald danwel spontaan overlijdt. Naast het percentage dieren dat uitvalt, kijken we in het pilotexperiment ook of de uitval plaats vindt in de periode van 18-21 dagen na inductie van EAM.

Indien de ratten atriale ontsteking ontwikkelen dan kan voor het EAM model worden overgegaan naar het hoofdexperiment. Indien de ratten door het bereiken van een humaan eindpunt uit de proef moeten worden gehaald, dan geldt dit als ernstig ongerief. Aan de hand van de hoeveelheid ratten dat uitvalt, bepalen we de benodigde groepsgroottes voor het hoofdexperiment.

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

De muizen krijgen eenmalig een injectie (i.p.) met 100.000 partikels coxsackievirus B3. Van de dosis en wijze van toediening weten we uit eerdere ervaringen dat in vrijwel alle muizen een identiek ziektebeeld en myocarditis veroorzaakt.

De ratten krijgen eenmalig, onder anesthesie (voor immobilisatie van de dieren), een injectie in de poot om de EAM op te wekken, met hierin een mix van varkens-myosine en Complete Freund's Adjuvant (CFA). Wij hebben contact met een onderzoeksgroep dat ervaring heeft met het EAM model, en uit onderzoek van deze groep is gebleken dat het injecteren van deze mix in de poot de meest betrouwbare methode is om EAM op te wekken.

Bij de EAM-ratten die worden gebruikt om de uitval te bepalen wordt onder de anesthesie wanneer de terminatie wordt uitgevoerd ook bloed afgenomen.

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

Aangezien het om een pilotexperiment gaat, hebben we besloten dat het niet zinvol is om de experimenten te onderwerpen aan berekeningen voor statistische significantie. Hierdoor kunnen we de groepen vrij klein houden en hoeven we geen controle dieren op te voeren.

B. De dieren

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

Acute virale myocarditis:

Diersoort: C3H muizen. Dit is de muizenstam waarmee wij al ervaring hebben voor acute virale myocarditis.

Herkomst: Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

Geschatte aantallen: maximaal 15 dieren.

We hebben 2 maal 5 muizen nodig (voor beide leeftijden 1 groep) om te beoordelen of de muizen atriale ontsteking en wel/geen ernstig ongerief krijgen. De overige 5 muizen zijn reserve als door onvoorziene omstandigheden het nodig is om een derde groep muizen op te voeren.

Levensstadia: 4 of 5 weken oud bij inductie acute myocarditis. Dit zijn de twee leeftijden waarvan we in het pilotexperiment willen onderzoeken of atriale ontsteking kan worden geïnduceerd in afwezigheid van ernstig ongerief.

EAM:

Diersoort: Lewis ratten. Dit is wereldwijd de meest gebruikte ratten-stam voor EAM modellen, en is ook de stam die gebruikt wordt met de onderzoeksgroep met wie wij contact hebben over het opzetten van dit model.

Herkomst: Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

Geschatte aantallen: maximaal 29 dieren.

Om te testen of we met EAM atriale ontsteking kunnen induceren hebben we 3 ratten nodig. Omdat we zelf nog geen ervaring hebben met dit model vragen wij ook 12 ratten als reserve aan. Met deze (reserve) ratten kunnen we het nog een aantal keer opnieuw proberen (in overleg met onderzoeksgroepen die dit model eerder gebruikt hebben) indien het niet gelijk lukt om de ratten atriale ontsteking te geven.

Voor de hier-opvolgende uitval-bepaling gebruiken wij 14 dieren. We willen om het aantal benodigde dieren te beperken deze groep toevoegen aan de analyse waarbij we de atriale ontstekingsrespons in kaart brengen. (zie bijlage '*Biomarkers vaststellen en valideren (hoofdexperiment)*'). Hierdoor willen we inclusief uitval minimaal 10 dieren over houden voor de analyse).

Het aantal van 10 ratten per groep voor analyse is gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen met dit model, waaruit dat blijkt dat groepen van 10 voldoende zijn om significante verschillen te kunnen aantonen op ontstekingsfactoren.

Levensstadia: circa 7 weken oud bij inductie EAM. De groep waarmee we contact hebben over dit model hanteert deze leeftijd.

Voor zowel het acute virale myocarditis model als het EAM model maken wij gebruik van mannelijke dieren. De reden hiervoor is dat in beide modellen mannetjes veel gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis dan vrouwtjes (*Frisancho-Kiss et al. Brain Res 2006; 1126: 139-147*). Omdat deze modellen minder goed werken in vrouwelijke dieren, zijn wij niet van mening dat het op dit punt al zinvol is om een onderscheid te maken tussen mannetjes en vrouwtjes. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.

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:

Ontstekingsreacties zijn complexe processen waarbij meerdere orgaansystemen betrokken zijn. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsresponsen na te bootsen met in vitro of ex vivo technieken.

Vermindering:

Aangezien het om een pilotexperiment gaat, hebben we besloten dat het niet nodig is om de experimenten te onderwerpen aan berekeningen voor statistische significantie. Hierdoor kunnen we de groepen vrij klein houden en hoeven we geen dieren te gebruiken voor een controle groep. Doordat we EAM induceren door injectie in de poot ontwikkelt 100% van de ratten EAM. Hierdoor hoeven we geen extra dieren op te voeren om hiervoor te compenseren.

Verfijning:

In deze studie maken we gebruik van de C3H muizenstam. Deze muizenstam heeft de eigenschap dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt in vergelijking met andere muizenstammen, waardoor de muizen relatief weinig ongerief zullen hebben. Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt.

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.

Om het ongerief voor de dieren te beperken worden de dieren gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden (temperatuur, lichtintensiteit en 12:12 uur dag: nacht cyclus). Ook krijgen de dieren na binnenkomst in het proefdiercentrum minimaal een week om te acclimatiseren.

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten uit de proef kunnen worden gehaald. Bij het EAM model beoordelen we de ratten in de periode 14-25 dagen na inductie van EAM twee maal per dag. Hierdoor verwachten we dat er geen dieren langer dan een halve dag ernstig ongerief zullen hebben.

Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt. Het experiment waarin we kijken naar de mortaliteit onder de ratten ten gevolge van EAM voeren we pas uit nadat we in een kleinere groep ratten hebben geconstateerd dat EAM ook voor ontsteking in de atria zorgt.

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 is op pubmed gezocht naar artikelen die gebruik maken van deze modellen. De uitvals-bepaling (percentage dieren dat uitvalt) voor het EAM model is al eerder uitgevoerd. Deze bepaling herhalen we in dit pilotexperiment omdat een eerder onderzoek door een andere groep geen garantie biedt dat uitval bij ons hetzelfde zal verlopen.

Daarnaast is er direct contact geweest met twee onderzoeksgroepen die ook met het EAM model hebben gewerkt, en die gezamenlijk in het verleden het bovengenoemde onderzoek hebben uitgevoerd waarin de uitval van ratten na inductie van EAM beschreven staat. (Center for Cardiovascular Research, Charité-University, Berlijn + Institute of Pathophysiology, Comenius University, Bratislava) Beide groepen hebben nooit naar de atria gekeken.

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.

De eerste drie dagen na inductie van EAM zullen de ratten wat pijn in de poot hebben ten gevolge van de injectie die ze in de poot krijgen. Doordat de pijn niet ernstig is, vinden wij het gebruik van zware pijnstillers (opiaten) niet verantwoord, gezien deze ook bijwerkingen veroorzaken. Lichtere pijnstillers (NSAIDs) vinden wij binnen ontstekingsmodellen ook geen goede optie, gezien deze een effect hebben op de ontstekingsrespons.

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?

Acute virale myocarditis:

1. In de eerste week na inductie van acute virale myocarditis worden de muizen ziek. Waarschijnlijk is dit vrij mild. Hierbij is er alleen voor een periode van 3 dagen een lichte gewichtsdip en vertonen de muizen vrijwel geen uiterlijke kenmerken van ongerief. Er bestaat een kleine mogelijkheid dat de muizen een ernstiger ziekteverloop krijgen, met een grotere gewichtsdip en duidelijke kenmerken van ongerief (pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug).
2. De muizen ondervinden een kort moment van stress bij het inspuiten van het virus.

EAM:

1. De eerste drie dagen na inductie van EAM hebben de ratten matig ongerief ten gevolge van de reactie op het geïnjecteerde varkens-mynosine + CFA, met een gewichtsdip en subtiele tekenen van ongerief (minder activiteit en pilo-erectie). Het pootje waarin is geïnjecteerd zal iets opzwellen, waardoor de ratten dit pootje minder goed kunnen gebruiken.
2. Een deel (naar verwachting 20-25%) van de ratten zal tussen dag 18 en 21 na inductie EAM ernstig ziek worden (gewichtsverlies, pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en zal dan uit de proef worden genomen. Verwacht wordt dat dit vrij abrupt optreedt, waardoor de ratten hier maximaal een halve dag last van zullen hebben.
3. De ratten zullen eenmalig ontwaken uit anesthesie.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Acute Virale Myocarditis:

1. Ontstekingsrespons ten gevolge van de injectie van het virus.
2. Fixeren muizen in combinatie met een intraperitoneale injectie.

EAM:

1. Ontstekingsrespons en zwelling ten gevolge van de injectie van de varkens-mynosine + CFA.
2. Ontsteking en necrose in het hart.
3. Ontwaken uit anesthesie, wat we toepassen om de injectie in de poot te kunnen zetten.

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

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief. We verwachten dat ratten die een humaan eindpunt bereiken (erstig ongerief) dit doen in de periode van 18-21 dagen na de inductie van EAM. Echter weten wij dit niet helemaal zeker, en voor de zekerheid controleren we daarom in de periode 14-25 dagen na de inductie van EAM de dieren twee maal per dag. Door in deze periode twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervindt minimaal. Om de zwelling van de pootjes bij het EAM model te beperken (punt 3) spuiten we een zo'n klein mogelijk volume in.

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 humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er **ernstig** ongerief wordt geconstateerd bij een dier. Het ongerief beoordelen we volgens onderstaande criteria:

Geen uiterlijke kenmerken van ongerief = **geen** of **licht** ongerief.

Milde uiterlijke kenmerken van ongerief (doffe vacht en afname van activiteit) met een gewichtsafname <20% ten opzichte van het startgewicht = **matig** ongerief.

Ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief (dichtgeknepen oogjes, gebolde rug, afwezigheid van activiteit en piloerectie) en/of een gewichtsafname >20% ten opzichte van het startgewicht = **ernstig** ongerief.

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

In theorie heeft elk proefdier kans om een humaan eindpunt te halen. Voor de muizen met acute virale myocarditis schatten wij de kans echter als vrij laag. In de groep ratten waarbij we de uitval door bereiken van een humaan eindpunt gaan beoordelen schatten wij de kans op 20-25% in. Voor overige ratten (die eerst gebruikt worden om te kijken of we bij de EAM-ratten atriale ontsteking kunnen induceren) is de kans ook vrij laag (<5%).

K. Classificatie van ongerief

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

Acute virale myocarditis:

Cumulatief ongerief: Matig

EAM:

Cumulatief ongerief: Matig, met verwacht ernstig ongerief bij circa 10-14% (3-4 ratten) van het totale aantal ratten (29 ratten):

- Maximaal 15 ratten zullen in proef blijven tot dag 18 na inductie van EAM. Deze ratten ondervinden matig ongerief, en we verwachten van geen van deze ratten dat het ongerief oploopt tot ernstig.
- 14 ratten blijven in proef tot en met dag 42 na inductie EAM. Voor deze groep verwachten we dat 20-25% (3-4 ratten) ernstig ongerief krijgt in de periode 18-21 dagen na inductie EAM. De overige ratten krijgen matig ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Vanwege het hartweefsel dat wij nodig hebben voor de analyses zullen de muizen en ratten getermineerd moeten worden.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | | |
|-----|--|--------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 11400 | |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | VU medisch centrum | |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | | 2 | Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) |

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.

Het hoofdexperiment bestaat uit twee onderdelen (zie ook schema in projectvoorstel 1.2.2). Eerst wordt de ontstekingsrespons in de atria in kaart gebracht (**deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking**), en vervolgens worden er analyses uitgevoerd voor het vaststellen en valideren van biomarkers voor atriale ontsteking (**deel 2: Biomarkers**)

Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:

Deel 1 wordt voor beide myocarditis-modellen (acute virale myocarditis en EAM) apart uitgevoerd, indien bij het betreffende model in het pilotexperiment is aangetoond dat er atriale ontsteking optreedt.

Voor zowel acute virale myocarditis als EAM is de proefopzet vergelijkbaar. Op meerdere tijdstippen na inductie van de myocarditis worden de dieren getermineerd en wordt hartweefsel weefsels en bloed uitgenomen. In het hartweefsel en bloed worden ontstekingsmarkers kwantitatief gemeten. Ook wordt gekeken naar remodeling (fibrose), wat optreedt in de atria na de ontstekingsrespons. Ook wordt vlak voor de terminatie gekeken naar de hartfunctie aan de hand van een electrocardiogram (ECG). Hiermee willen we beoordelen of de muizen en ratten spontaan atriumfibrilleren ontwikkelen door de ontsteking en daaropvolgende remodeling. In het geval van acute virale myocarditis wordt ook de hoeveelheid virus gemeten in de atria.

Uitkomstparameters voor alle tijdstippen:

- Hoeveelheid ontsteking (gemeten in hartweefsel en bloed)
- Hoeveelheid remodeling (fibrose)
- Hartfunctie (wel/geen afwijkingen op ECG)

- Aanwezigheid virus (alleen bij acute virale myocarditis)

Deel 2: Biomarkers:

In dit experiment wordt gezocht naar potentiële biomarkers die verhoogd of verlaagd tot expressie komen bij atriale ontsteking. Hiervoor voeren wij voor beide modellen systematische gen/eiwit expressie analyses (bijvoorbeeld een microarray of proteomics analyse) uit op hartweefsel en bloed van controle muizen/ratten, muizen/ratten met atriale ontsteking en muizen/ratten waarbij ontstekingsfase al is afgelopen en de herstel/remodeling fase aan de gang is (fibrose). De optimale tijdstippen na de inductie van EAM of acute virale myocarditis die we hiervoor gebruiken baseren wij op bevindingen van deel 1.

Van potentieel interessante genen/eiwitten die uit deze analyses naar voren komen voeren wij daarna voor zowel het EAM model als acute virale myocarditis model een validatie-experiment uit waarbij we het atriaal hartweefsel en bloed analyseren met gen/eiwit specifieke analyses (bijvoorbeeld een qPCR of ELISA). Dit doen wij voor dezelfde drie groepen/tijdstippen: controle muizen/ratten, muizen/ratten met atriale ontsteking en muizen/ratten waarbij ontstekingsfase al is afgelopen en de herstelfase aan de gang is (fibrose)

Primaire uitkomstparameters:

- Verhoging of verlaging gen/eiwit expressies in hartweefsel en bloed.

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

De muizen krijgen eenmalig een injectie (i.p.) met 100.000 partikels coxsackievirus B3. Van de dosis en wijze van toediening weten we uit eerdere ervaringen dat in vrijwel alle muizen een identiek ziektebeeld en myocarditis veroorzaakt.

De ratten krijgen, onder anesthesie, eenmalig een injectie in de poot om de EAM op te wekken, met hierin een mix van varkens-mynosine en Complete Freund's Adjuvant (CFA). Wij hebben contact met een onderzoeksgroep dat ervaring heeft met het EAM model. Uit onderzoek van deze groep is gebleken dat het injecteren van deze mix in de poot de beste methode is om EAM op te wekken.

Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:

Er wordt bij alle dieren eenmalig (vlak voor de anesthesie behorend bij de terminatie) een ECG-meting gedaan door de dieren in een zogeheten ECG-tunnel te plaatsen. Tijdens de anesthesie waarin de dieren ook worden getermineerd wordt er bloed afgenomen.

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

De groepsgroottes worden gebaseerd op onze eerdere ervaringen met acute virale myocarditis modellen. Hiervan weten we dat de groepen groot genoeg zijn om significante verschillen aan te kunnen tonen (gebaseerd op ontsteking in de ventrikels), maar niet dusdanig groot dat er muizen worden 'verspild'.

Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:

Verder beperken we de hoeveelheid groepen tot het minimale aantal dat nodig is om de ontstekings- en herstelrespons in kaart te brengen. We weten al uit eerdere ervaringen met C3H muizen dat op het moment dat de herstelrespons in gang treedt, het virus al is ge-elimineert. Hierdoor zullen we voor de latere tijdstippen geen C3H muizen gebruiken voor een analyse naar de hoeveelheid virus in de atria.

Voor het EAM model kunnen we met informatie uit het pilotexperiment een inschatting maken over de hoeveelheid ratten die per groep nodig zijn om statische verschillen te kunnen aantonen (in verband met uitval). Het materiaal van de ratten uit het pilotexperiment die zijn gebruikt voor het inschatten van het uitval zullen ook gebruikt worden voor het in kaart brengen van de ontstekingsrespons. Hierdoor hoeven we voor het tijdstip dat deze ratten zijn getermineerd niet opnieuw een groep ratten op te voeren.

Deel 2: Biomarkers:

Voor het EAM model kunnen we met informatie uit het pilotexperiment en deel 1 een inschatting maken over de hoeveelheid ratten die per groep nodig zijn om statische verschillen te kunnen aantonen.

De biomarker-analyses voeren we niet uit voor alle tijdstippen van deel 1. Het aantal meegenomen tijdstippen voor de analyses (twee tijdstippen plus een controle groep) is het minimale aantal dat nodig is om geschikte biomarkers te vinden.

B. De dieren

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

Voor zowel het acute virale myocarditis model als het EAM model maken wij gebruik van mannelijke dieren. De reden hiervoor is dat in beide modellen mannetjes veel gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis dan vrouwtjes (*Frisancho-Kiss et al. Brain Res 2006; 1126: 139-147*). Omdat deze modellen minder goed werken in vrouwelijke dieren, zijn wij niet van mening dat het op dit punt al zinvol is om een onderscheid te maken tussen mannetjes en vrouwtjes. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.

Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:

Acute virale myocarditis:

Diersoort: C3H muizen. Dit is de muizenstam waarmee wij al ervaring hebben voor acute virale myocarditis.

Herkomst: Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

Geschatte aantallen: maximaal 130 dieren.

Zeven tijdstippen waarop muizen getermineerd worden plus een controle groep, elk met maximaal 10 muizen ($8 \times 10 = 80$):

- dag 4 (begin ontstekingsrepons)
- dag 7 (piek innate immuunrespons)
- dag 10 (piek adaptieve immuunrespons)
- dag 14 (virus geëlimineerd)
- dag 21 (begin remodeling fase)
- dag 35 (remodeling fase)
- dag 49 (late remodeling fase)

Dit tijdsframe is gebaseerd op kennis van acute virale myocarditis in de ventrikels van de muis

Voor de eerste vijf tijdstippen worden hier boven op maximaal 10 andere muizen gebruikt voor bepaling van de hoeveelheid virus in de atria ($80 + 50 = 130$). Deze analyse gebeurt in ingevroren weefsel en kan daarom niet worden uitgevoerd op dezelfde muizen als waarin we kijken naar ontsteking en remodeling (waarvoor we formaldehyde-gefixeerd weefsel gebruiken). Van deze groepsgrootte (10 per groep) weten we vanuit eerdere ervaringen met het model dat het voldoende is om significante verschillen aan te tonen.

Levensstadia: 4 of 5 weken oud bij inductie acute myocarditis, afhankelijk van de uitkomsten van het pilotexperiment.

EAM:

Diersoort: Lewis ratten. Dit is wereldwijd de meest gebruikte ratten-stam voor EAM modellen, en is ook de stam die gebruikt wordt met de onderzoeksgroep met wie wij contact hebben over het opzetten van dit model.

Herkomst: Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

Geschatte aantallen: maximaal 94 dieren.

zeven tijdstippen, elk met maximaal 14 ratten ($7 \times 14 = 98$). Voor één van de zeven tijdstippen (dag 42) gebruiken we de groep ratten die ook al zijn opgevoerd in het pilotexperiment om de uitval van ratten te

bepalen. ($98-14=84$). Tenslotte nemen we een controle groep mee van 10 ratten ($84+10=94$):

- dag 7 (pre-ontsteking) = **maximaal 14 ratten**
 - dag 10 (begin ontstekingsrepons) = **maximaal 14 ratten**
 - dag 14 (vroeg ontsteking) = **maximaal 14 ratten**
 - dag 21 (Piek ontsteking) = **maximaal 14 ratten**
 - dag 28 (late ontsteking, vroege remodeling = **maximaal 14 ratten**
 - dag 42 (remodeling fase) = (pilotexperiment)
 - dag 56 (late remodeling fase) = **maximaal 14 ratten**
 - controle = **10 ratten**
- Totaal = maximaal 94 ratten**

Dit tijdsframe is gebaseerd op kennis van EAM in de ventrikels van de rat

Het maximum van 94 is het aantal dieren dat we nodig hebben voor de analyses (10), plus het aantal dieren dat we door het bereiken van een humaan eindpunt uit proef moeten halen (0 tot maximaal 4, wordt per tijdstip apart bepaald). Met de informatie uit het pilotexperiment weten we hoeveel ratten er zullen uitvallen, en op welke tijdstipen we dit uitval kunnen verwachten. Hiermee zal het uiteindelijke aantal ratten dat we per tijdstip nodig hebben worden bepaald.

Dit aantal van 10 ratten per groep voor analyse is gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen met dit model, waaruit blijkt dat groepen van 10 voldoende zijn om significante verschillen te kunnen aantonen op ontstekingsfactoren.

Levensstadia: circa 7 weken oud bij inductie EAM. De groep waarmee we contact hebben over dit model hanteert deze leeftijd.

Deel 2: Biomarkers:

Acute virale myocarditis:

Diersoort: C3H muizen. Dit is de muizenstam waarmee wij al ervaring hebben voor acute virale myocarditis.

Herkomst: Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

Geschatte aantallen: maximaal 66 dieren.

Twee tijdstipen plus een controle groep, elk met maximaal 10 muizen ($3 \times 10 = 30$), voor zowel de systematische analyse als de daaropvolgende validatie-experiment ($2 \times 30 = 60$) Voor gen-expressie in de atria van de muizen schatten we in dat de spreiding vergelijkbaar zal zijn als de spreiding van de hoeveelheid ontsteking, waardoor we voor deze muizen ook groepen van 10 aanhouden.

Van deze groepsgrootte (10 per groep) weten we vanuit eerdere ervaringen met het model dat het voldoende is om significante verschillen aan te tonen.

Bovenstaande berekening van het aantal proefdieren (60 dieren in totaal) gaat uit van 10 muizen voor de analyse. Als we constateren in deel 1 dat de spreiding van ontsteking in de atria dusdanig groot is dat 10 muizen per groep niet meer voldoende geschat wordt om significante verschillen te vinden (dit achten wij niet waarschijnlijk), worden de groepen voor het validatie-experiment uitgebreid tot maximaal 12 per groep. In dit geval zullen we maximaal 6 muizen extra nodig hebben (2 extra voor elk van de drie muizen-groepen), waarmee het totale aantal muizen zal uitkomen op maximaal 66 dieren.

Levensstadia: 4 of 5 weken oud bij inductie acute myocarditis, afhankelijk van de uitkomsten van het pilotexperiment

EAM:

Diersoort: Lewis ratten. Dit is wereldwijd de meest gebruikte ratten-stam voor EAM modellen, en is ook de stam die gebruikt wordt met de onderzoeksgroep met wie wij contact hebben over het opzetten van dit

model.

Herkomst: Erkende fokker. Om de kwaliteit van de gebruikte dieren te waarborgen bestellen wij alleen dieren bij een erkende leverancier (zoals Charles River, Harlan of Janvier).

Geschatte aantallen: maximaal 82 dieren.

Twee tijdstippen, elk met maximaal 14 ratten plus een controle groep van 10 ratten ($14+14+10 = 38$), en dit voor zowel de systemische biomarker analyse als het daaropvolgende validatie-experiment ($2 \times 38 = 76$).

We voeren dit validatie-experiment uit op een nieuwe groep ratten omdat het materiaal dat overblijft na de systematische biomarker analyse niet voldoende is om een validatie-experiment op uit te voeren.

Voor het uitvoeren van de systemische analyse of hartweefsel en eiwit zijn 10 ratten per tijdstip nodig, evenals voor de ratten waarin we vervolgens de gevonden biomarkers gaan valideren (net zoals bij de muizen schatten we de spreiding van genen/eiwitten in de atria/ het bloed vergelijkbaar in als de hoeveelheid ontsteking). Voor de ratten waarbij EAM wordt geïnduceerd wordt eventueel maximaal 4 extra ratten meegenomen om te compenseren voor uitval ($10+4=14$). Dit wordt bepaald aan de hand van de uitkomsten van het pilotexperiment.

Het aantal van 10 ratten per groep voor analyse is gebaseerd op ervaringen van andere onderzoeksgroepen met dit model, waaruit dat blijkt dat groepen van 10 voldoende zijn om significante verschillen te kunnen aantonen op ontstekingsfactoren.

Bovenstaande berekening van het aantal proefdieren (76 dieren in totaal) gaat uit van 10 ratten voor de analyse. Als we constateren in deel 1 dat de spreiding van ontsteking in de atria dusdanig groot is dat 10 ratten per groep niet meer voldoende geschat wordt om significante verschillen te vinden (dit achten wij niet waarschijnlijk), worden de groepen voor het validatie-experiment uitgebreid tot maximaal 12 per groep. In dit geval zullen we maximaal 6 ratten extra nodig hebben voor het validatie-experiment (2 extra voor elk van de drie groepen ratten), waarmee het totale aantal ratten zal uitkomen op maximaal 82 dieren.

Levensstadia: circa 7 weken oud bij inductie EAM. De groep waarmee we contact hebben over dit model hanteert deze leeftijd.

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:

Ontstekingsreacties zijn complexe entiteiten waar meerdere orgaansystemen bij betrokken zijn. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsresponsen na bootsen met in vitro of ex vivo technieken.

Ook is het niet mogelijk dit onderzoek uit te voeren met patiënten.

De patiëntengroep waar de bevindingen uit deze studie uiteindelijk naar wordt geëxtrapoleerd zijn patiënten bij wie myocarditis wordt gediagnosticeerd. Bij deze patiënten worden geen ingrepen uitgevoerd waarbij we aan weefsel uit de atria kunnen komen.

Bij deze patiënten kunnen we dus niet een biomarker vinden in het bloed wat gecorreleerd kan worden aan ontsteking in de atria. Er zijn wel twee andere patiëntengroepen waarbij het mogelijk is om aan zowel atriaal weefsel als bloed van dezelfde patiënt te komen. Dit zijn enerzijds patiënten met atrium fibrilleren waarbij operatief een deel van het atrium wordt verwijderd, en anderzijds patiënten die voor een bypass/klep operatie aan een hart-longmachine worden gekoppeld.

Echter, omdat elke patiënt qua leeftijd, medische geschiedenis en genetische achtergrond vrijwel uniek is zou je per patiënt apart een systematische weefselanalyse (bijvoorbeeld een RNAseq analyse) moeten uitvoeren en een immunohistochemische analyse om te bepalen hoeveel ontsteking de patiënt heeft in de atria. Dit is niet haalbaar met de hoeveelheid weefsel dat per patiënt wordt uitgenomen. Bovendien heeft myocarditis een zeer karakteristiek ontstekingspatroon. Patiënten die een hartoperatie ondergaan kunnen ontsteking in de atria hebben, maar dit is hierdoor niet goed te extrapoleren naar de ontstekingsrespons van myocarditis patiënten. De myocarditis diermodellen beschreven in deze aanvraag hebben wel een vergelijkbaar ontstekingspatroon als bij myocarditis patiënten. Ten slotte kunnen we van deze patiënten geen ventrikel-weefsel analyseren. Dit is essentieel, omdat om een biomarker te vinden dat specifiek is voor ontsteking in de atria, we ook moeten weten of deze biomarker tot expressie komt in de ventrikels.

Vermindering:

De groepsgroottes worden gebaseerd op onze eerdere ervaringen met acute virale myocarditis modellen, en ervaringen van andere groepen die het EAM model hebben gebruikt. Hiervan weten we dat de groepen groot genoeg zijn om significante verschillen aan te kunnen tonen, maar niet dusdanig groot dat er muizen/ratten worden 'verspild'. Omdat we momenteel niet precies weten wat de spreiding is van ontsteking in de atria voor beide modellen zijn de aantallen genoemd in deze bijlage een benadering. De daadwerkelijke hoeveelheid dieren die we nodig hebben voor de biomarkeranalyses zal worden bepaald aan de hand van de pilotexperimenten en deel 1 van het hoofdexperiment.

Doordat we EAM induceren door injectie in de poot ontwikkelt 100% van de ratten EAM. Hierdoor hoeven we geen extra dieren op te voeren om hiervoor te compenseren.

Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:

Verder beperken we de hoeveelheid groepen tot het minimale aantal dat nodig is om de ontstekings- en herstelrespons in kaart te brengen. We weten al uit eerdere ervaringen met C3H muizen dat op het moment dat de herstelrespons in gang treedt, het virus al is ge-elimineert. Hierdoor zullen we voor de latere tijdstippen geen C3H muizen gebruiken voor een analyse naar de hoeveelheid virus in de atria.

Het materiaal van de ratten uit het pilotexperiment die zijn gebruikt voor het inschatten van de uitval zullen ook gebruikt worden voor het in kaart brengen van de ontstekingsrespons. Hierdoor hoeven we voor het tijdstip dat deze ratten zijn getermineerd niet opnieuw een groep ratten op te voeren. Doordat we EAM induceren door injectie in de poot ontwikkelt 100% van de ratten EAM. Hierdoor hoeven we geen extra dieren op te voeren om hiervoor te compenseren.

Deel 2: Biomarkers:

De biomarker-analyses voeren we niet uit voor alle tijdstippen van deel 1. Het aantal meegenomen tijdstippen voor de analyses (twee tijdstippen plus een controle groep) is het minimale aantal dat nodig is om geschikte biomarkers te vinden.

Verfijning:

In deze studie maken we gebruik van de C3H muizenstam. Deze muizenstam heeft de eigenschap dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt in vergelijking met andere muizenstammen, waardoor de muizen relatief weinig ongerief zullen hebben. Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt.

Deel 1: In kaart brengen atriale ontsteking:

Hartfunctie (ECG) meten we met behulp van een ECG-tunnel: (http://ecg.emka.fr/5-emka_technologies_ecgtunnel_for_rodents-3.html) Hierbij worden de dieren (wakker) in een buis geplaatst, die vervolgens een ECG van de dieren maakt. Dit heeft het voordeel boven conventionele ECG-apparatuur (wat gebruikt maakt van invasieve electrodes) dat hiervoor de dieren niet onder anesthesie hoeven worden

gebracht. Hierdoor kunnen we ECG-metingen uitvoeren met minimaal ongerief voor de muizen en ratten.

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.

Om het ongerief voor de dieren te beperken worden de dieren gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden (temperatuur, lichtintensiteit en 12:12 uur dag:nacht cyclus). Ook krijgen de dieren na binnenkomst in het proefdiercentrum minimaal een week om te acclimatiseren.

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten snel uit proef kunnen worden gehaald. Bij het EAM model beoordelen we de ratten in de risicoperiode (periode waarin verwacht wordt dat 20-25% van de dieren uitvalt: 18-21 dagen na inductie EAM) twee maal per dag. (18-21 dagen is een voorlopige inschatting, en zal eventueel worden bijgesteld aan de hand van onze observaties in het pilotexperiment).

Voor het induceren van de EAM houden wij het injectievolume zo klein mogelijk, wat de zwelling (en bijbehorend ongerief) van het pootje minimaal houdt.

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 is op pubmed gezocht naar artikelen die gebruik maken van dit model. Wij hebben geen publicaties gevonden waarbij deze experimenten al eerder zijn uitgevoerd.

Daarnaast is er contact geweest met twee onderzoeksgroepen die ook met het EAM model hebben gewerkt in het verleden, en beide groepen hebben nooit naar de atria gekeken. (Center for Cardiovascular Research, Charité-University, Berlijn + Institute of Pathophysiology, Comenius University, Bratislava)

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.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De eerste drie dagen na inductie van EAM zullen de ratten wat pijn in de poot hebben ten gevolge van de injectie die ze in de poot krijgen. Doordat de pijn niet ernstig is, vinden wij het gebruik van zware pijnstillers (opiaten) niet verantwoord, gezien deze ook bijwerkingen veroorzaken. Lichtere pijnstillers (NSAIDs) vinden wij binnen ontstekingsmodellen ook geen goede optie, gezien deze een effect hebben op de ontstekingsrespons.

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?

Acute virale myocarditis:

1. In de eerste week na inductie van acute virale myocarditis worden de muizen ziek. Dit ziekteverloop is vrij mild. Hierbij is er alleen voor een periode van 3 dagen een lichte gewichtsdip en vertonen de muizen vrijwel geen uiterlijke kenmerken van ongerief.
2. De muizen krijgen een kort moment van stress bij het inspuiten van het virus.

Alleen in deel 1:

3. Alle muizen ondergaan een ECG-meting, wat een beetje stress kan opleveren.

EAM:

1. De eerste drie dagen na inductie van EAM hebben de ratten matig ongerief ten gevolge van de reactie op het geïnjecteerde varkens-myosine + CFA, met een gewichtsdip en subtiele tekenen van ongerief (minder activiteit en pilo-erectie). Het pootje waarin is geïnjecteerd zal iets opzwellen, waardoor de ratten dit pootje minder goed kunnen gebruiken.
2. Een deel van de ratten (naar verwachting 20-25%) zal tussen dag 18 en 21 na inductie EAM ernstig ziek worden (gewichtsverlies, pilo-erectie, inactiviteit, dichtgeknepen oogjes, gebolde rug) en uit proef worden genomen. Verwacht wordt dat dit vrij abrupt optreedt, waardoor de ratten hier maximaal een dag last van zullen hebben.
3. De ratten zullen eenmalig ontwaken uit anesthesie.

Alleen in deel 1:

4. Alle ratten ondergaan een ECG-meting, wat een beetje stress kan opleveren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Acute virale myocarditis:

1. Ontstekingsrespons ten gevolge van de injectie van het virus.
2. Fixeren muizen in combinatie met een intraperitoneale injectie.
3. De dieren worden kort opgesloten in een ECG-tunnel, wat de bewegingsvrijheid beperkt.

EAM:

1. Ontstekingsrespons en zwelling ten gevolge van de injectie van de varkens-myosine + CFA.
2. Ontsteking en necrose in het hart.
3. Ontwaken uit anesthesie, wat we toepassen om de injectie in de poot te kunnen zetten.
4. De dieren worden kort opgesloten in een ECG-tunnel, wat de bewegingsvrijheid beperkt.

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

De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten meteen uit de proef kunnen worden gehaald. Bij het EAM model beoordelen we de ratten in de periode waarin we in het pilotexperiment hebben geconstateerd dat er bij dieren ernstig ongerief optreedt twee maal per dag. Om de zwelling van de pootjes bij het EAM model te beperken (punt 3) spuiten we een zo'n klein mogelijk volume in.

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 humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er **ernstig** ongerief wordt geconstateerd bij een dier. Het ongerief beoordelen we volgens onderstaande criteria:

Geen uiterlijke kenmerken van ongerief = **geen** of **licht** ongerief.

Milde uiterlijke kenmerken van ongerief (doffe vacht en afname van activiteit) met een gewichtsafname <20% ten opzichte van het startgewicht = **matig** ongerief.

Ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief (dichtgeknepen oogjes, gebolde rug, afwezigheid van activiteit en piloerectie) en/of een gewichtsafname >20% ten opzichte van het startgewicht = **ernstig** ongerief.

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

In theorie heeft elk proefdier kans om een humaan eindpunt te halen. Voor de muizen met acute virale myocarditis schatten wij de kans vrij laag (<5%). We schatten dat van de dieren die langer dan 18 dagen in proef zullen zitten na inductie van EAM de kans 20-25% is dat een humaan eindpunt bereikt. Voor de overige ratten is de kans vrij laag (<5%).

K. Classificatie van ongerief

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

Acute virale myocarditis:

Cumulatief ongerief: Matig

EAM:

Cumulatief ongerief: Matig, met verwacht ernstig ongerief bij circa 16% (circa 26 dieren) van het totale aantal ratten (circa 164 dieren).

We verwachten dat voor alle dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (102 dieren) er 25% ernstig ongerief zullen krijgen (circa 26 dieren). Alle overige ratten hebben matig ongerief.

Dit is een voorlopige inschatting, gebaseerd op de kennis die wij hebben vanuit andere groepen die met het EAM model hebben gewerkt. Het aantal ratten in deze berekening komt niet overeen met de aantallen genoemd in onderdeel B, omdat die aantallen uitgaan van een eventueel hogere uitval (maximale aantallen).

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.

Vanwege het hartweefsel en bloed dat wij nodig hebben voor de analyses zullen de muizen en ratten getermineerd moeten worden

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

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project:

Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis

3. Titel van de NTS:

Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning*
- wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: 26-11-2015*
- aanvraag compleet: 26-11-2015*
- in vergadering besproken: 8-12-2015*
- anderszins behandeld: *n.v.t.*
- termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: n.v.t.*
- advies aan CCD: 11-04-2016*

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: *14-12-2015, 20-1-2016, 2-2-2016 en 22-02-2016*
- Strekking van de vraag / vragen:

NTS is nog slordig, moet netter en er staan meerder spellingsfouten in de aanvraag. Men moet meer vertellen over de translatie naar de humane situatie. Het wetenschappelijk belang beter toelichten/onderbouwen en de strategie aanpassen. Waarom gebruikt men 2 verschillende modellen?

Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels.

- Datum antwoord: 30-12-2015, 27-1-2016, 15-02-2016 en 09-03-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en):
De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: één van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project en is niet betrokken geweest bij de advisering.*

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 doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Myocarditis is een ontstekingsziekte van het myocard ofwel de hartspier. Een veel voorkomende complicatie bij myocarditis patiënten is het ontstaan van atriumfibrilleren (boezemhartritmestoornis). Dit kan grote gevolgen hebben voor de patiënt, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte.

Dit onderzoeksproject heeft als doel het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis. Met dit onderzoek wil men diagnostische biomarkers in het bloed vinden die specifiek zijn voor deze atriale ontsteking.

Het uiteindelijke doel is om bij patiënten met myocarditis atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen. Myocarditis is een brede ziekte is met meerdere onderliggende mechanismen. Bij de meeste patiënten is myocarditis de oorzaak van een acute virale infectie of een auto immuunrespons. Daarom gebruikt men tijdens dit onderzoek twee diermodellen: Het autoimmuun myocarditis (EAM) model en het acute

virale myocarditismodel.

3. *De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:*

Het wetenschappelijk belang: Er is weinig bekend over het effect van myocarditis op de atria. Door de analyses die men gaat uitvoeren krijgt men meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis.

Het maatschappelijk belang:

Atriumfibrilleren is een zeer lastig te behandelen chronische aandoening wat ernstige gevolgen voor de patiënt kan hebben, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte. Myocarditis is een van de hartaandoeningen die kan leiden tot atriumfibrilleren.

Deze studie zal bijdragen aan de ontwikkeling van diagnostische biomarkers om atriale ontsteking in myocarditis patiënten te identificeren. Hiermee kan de gevoeligheid voor atriumfibrilleren worden opgespoord en daarna behandeld worden. Dit kan uiteindelijk leiden tot een verlaging van de incidentie van atriumfibrilleren en de daaraan gerelateerde morbiditeit en mortaliteit.

Hoewel er algemene biomarkers zijn die ontsteking kunnen aantonen, kunnen deze niet specifiek aan de atria (hartboezems) worden gekoppeld en zijn dus niet bruikbaar voor het specifiek diagnosticeren van atriale ontsteking. Daarom zijn er nieuwe biomarkers nodig, die wel specifiek zijn voor atriale ontsteking.

4. *Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.*

Deze eerder gevonden resultaten maken het aannemelijk dat de voorgestelde therapie een gunstig effect zal hebben. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren.

Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. Voor beide modellen gebruikt men mannelijke dieren, omdat mannetjes gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.

De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project nieuwe en/of aanvullende inzichten en therapieën zullen worden ontwikkeld. De nieuw verkregen inzichten en

therapieën kunnen op termijn bij patiënten worden toegepast, wat de kansen op remissie en op uiteindelijke genezing doet toenemen. De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC een toetsbare eenheid.

5. *Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.*
6. *Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het verwachte ongerief is over het algemeen matig in beide diermodellen (92%) en voor een klein deel van de dieren (max 8%) verwacht men ernstig ongerief.*

Bij het acute virale myocarditis model wordt voor alle muizen maximaal matig ongerief verwacht.

Bij het EAM model wordt over het algemeen matig ongerief en in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat van alle ratten die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal ondervinden (circa 30 dieren). Voor de overige ratten wordt matig ongerief verwacht.

Onder ernstig ongerief vallen ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief en/of een gewichtsafname van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht. Een humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er ernstig ongerief wordt geconstateerd bij een dier, dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.

7. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de **vervanging** van dierproeven. Het gebruik van proefdierrijke methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

Ontstekingsreacties zijn zeer complex, en meerdere orgaansystemen zijn bij dit proces betrokken. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsreacties na te bootsen met in vitro experimenten. Het onderzoek naar diagnostische markers voor atriale ontsteking kan niet bij mensen worden uitgevoerd, omdat het niet mogelijk is om bij levende myocarditis patiënten zonder atriumfibrilleren aan het weefsel van de atria (hartboezems) te komen.

In dit project wordt daarom gebruikt gemaakt van twee diermodellen, welke de meest frequent voorkomende vormen van myocarditis bij humane patiënten weergeven: autoimmuun myocarditis (EAM) model en acute virale myocarditismodel. Voor de eerste model wordt gebruik gemaakt van een ratmodel met autoimmuun myocarditis (EAM), voor het tweede model zijn geen geschikte rat-modellen, hier maakt men gebruik van een muismodel met acute coxsackievirus B3-geïnduceerde myocarditis. Beide diermodellen zijn goed beschreven en worden wereldwijd gebruikt voor myocarditis. Het toepassen van beide modellen is essentieel, zodat het onderzoek extrapoleerbaar is naar alle patiënten.

8. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.*

Door gebruik te maken van een pilot experiment, het gefaseerd uitvoeren van de

experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren, is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van 3 jaar. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 211 muizen en 205 ratten, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.

Men beperkt zich bij het meten tot de tijdsunten waarbij de meeste ontsteking te zien is, hierdoor blijft het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten beperkt. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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.*

Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en dierverzorgers uitgevoerd en waar mogelijk wordt pijnstilling of verdoving toegepast. Om stress te voorkomen worden de dieren na acclimatisatie gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden.

De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd, eerst wordt een pilot gedaan, om ervoor te zorgen dat er zo weinig mogelijk dieren ernstig ongerief ondervinden. Wanneer er ernstig ongerief wordt geconstateerd is het humane eindpunt bereikt en wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd. De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten uit de proef kunnen worden gehaald.

Voor het acute virale myocarditismodel gebruikt men een muizenstam die de eigenschap heeft dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt, waardoor de muizen maximaal matig ongerief zullen ervaren. Bij het EAM model zal maximaal 25% van de dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (circa 30 dieren) ernstig ongerief ondervinden. Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal. Tevens wordt er zo'n klein mogelijk volume ingespoten om de zwelling van de pootjes te beperken.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

D. Ethische afweging

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis.

Het verwachte resultaat, atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen bij patiënten met myocarditis, is afgewogen tegen het, overwegend matige en bij maximaal 30 ratten als ernstige ingeschatte ongerief, aantasting van integriteit en het doden van de dieren in de proef.

Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Zowel het wetenschappelijke als het maatschappelijke belang worden door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere behandelingsmethoden voor patiënten.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn wordt behaald. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en het daarbij verwachte overwegend matige en bij maximaal 30 ratten ernstige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de vergunning te verlenen*

2. *Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheid.*

Eén lid van de DEC maakt een andere afweging, gezien het mogelijk ernstig ongerief voor maximaal dertig dieren. Het lid vraagt zich af of dergelijk ongerief wel kan worden gerechtvaardigd. Lijden is wellicht voor een belangrijke mate diersoort onafhankelijk. Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, gaat dit lid niet mee in het positieve advies van de commissie.

Hoewel in dit project gebruik van een zwaar ziektemodel onvermijdelijk is, waarbij een belangrijk deel van de dieren mogelijk ernstig ongerief zal ondervinden, acht de DEC dat met het beschreven project belangrijk inzicht gevonden zal worden in het proces van atriale ontsteking bij myocarditis. Bovendien wordt in 2 verschillende modelsystemen naar dit proces gekeken (te weten; viraal en auto-immuun), wat de belangen verder vergroot. Met het behalen van de projectdoelen kunnen duidelijke stappen voorwaarts gezet worden in de ontwikkeling van mogelijke diagnostiek van deze ziekte in de kliniek. De meerderheid van de DEC vindt deze grote wetenschappelijke en maatschappelijke belangen in voldoende mate opwegen tegen de geschade dierenbelangen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam



van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie


Aanvraagnummer
AVD114002016513

Bijlagen

2

Datum 11 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD114002016513. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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: 11400

Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam

Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde:

██████████

KvK-nummer: 64156338

Straat en huisnummer: de Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Afdeling crediteuren VU Medisch Centrum

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

██

Functie:

██████████

Afdeling:

██████████

Telefoonnummer:

██████████

E-mailadres:

██

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

KvK-nummer: 083547708
Naam: [REDACTED]
Adres: van der Boechhorststraat 1
Postcode en plaats: 1081 BT AMSTERDAM

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

- Een projectvergunning aanvragen
- Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
- Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
- Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift
- Alle bovenstaande opties

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

- Nieuwe aanvraag
- Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Over uw project

Geplande startdatum: 1 juni 2016
Geplande einddatum: 1 juni 2019
Titel project: Het diagnosticeren en behandelen van artriale ontsteking bij myocardits
Titel niet-technische samenvatting: Het diagnosticeren en behandelen van artriale ontsteking bij myocardits
Naam DEC: DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum
Postadres DEC: [REDACTED] Amsterdam / Nederland
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 11 april 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te
Amsterdam

van der Boechhorststraat 1
1081 BT AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD114002016513

Bijlagen

2

Datum 11 april 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 april 2016
Vervaldatum: 11 mei 2016
Factuurnummer: 16700513
Ordernummer: Inkoopordernummer 4573361

| Omschrijving | Bedrag |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD114002016513 | € 1.187,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

De Boelelaan 1117
1081 HV Amsterdam

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002016513

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum 4 mei 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op **11 april 2016** hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

1) Uw onderzoek begint met een pilot studie voor beide diermodellen. Indien niet aan de voorwaarden wordt voldaan (voor AVM: atriale ontsteking en geen ernstig ongerief; voor EAM: atriale ontsteking) zal dit voor dit model een no-go zijn. Daarnaast beschrijft u dat het gebruik van 2 diermodellen essentieel is omdat u alleen met beide modellen een compleet beeld kunt krijgen in hoeverre de gevonden biomarkers in deze studie extrapoleerbaar zijn naar de totale myocarditis populatie.

Kunt u verhelderen of en hoe u het project zult continueren indien uit de pilot van 1 van de modellen blijkt dat deze niet aan de gestelde voorwaarden voldoet? Indien slechts met 1 model kan worden doorgedaan, kunt u dan aangeven of het project dan nog voldoende zinvol is om door te gaan met dit ene model?

2) De inductie van EAM vindt plaats door injectie in het pootje. Gaat het hier om injectie in de voetzool of aan de bovenkant van het pootje. Indien het gaat om voetzoolimmunisatie, worden de dieren dan gehuisvest op extra dikke bedding (zoals is aangegeven in de Code of Practice voor immuniseren van proefdieren)?

Datum

4 mei 2016

Onze referentieAanvraagnummer
AVD114002016513**Leges**

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn ontvangen. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post



Melding

Bijlagen via de post

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

1 Uw gegevens

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

2 Bijlagen

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

3 Ondertekening

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

Hierbij de antwoorden op de vragen van de CCD bij het project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513 naar aanleiding van uw brief op 4 mei 2015.

Vraag 1) Uw onderzoek begint met een pilot studie voor beide diermodellen. Indien niet aan de voorwaarden wordt voldaan (voor AVM: atriale ontsteking en geen ernstig ongerief; voor EAM: atriale ontsteking) zal dit voor dit model een no-go zijn. Daarnaast beschrijft u dat het gebruik van 2 diermodellen essentieel is omdat u alleen met beide modellen een compleet beeld kunt krijgen in hoeverre de gevonden biomarkers in deze studie extrapoleerbaar zijn naar de totale myocarditis populatie. Kunt u verhelderen of en hoe u het project zult continueren indien uit de pilot van 1 van de modellen blijkt dat deze niet aan de gestelde voorwaarden voldoet? Indien slechts met 1 model kan worden doorgegaan, kunt u dan aangeven of het project dan nog voldoende zinvol is om door te gaan met dit ene model?

Antwoord vraag 1) Een mogelijk scenario na het uitvoeren van de pilotexperimenten voor beide modellen het resultaat is dat voor één van beide modellen aan de criteria wordt voldaan om te starten met het hoofdexperiment, maar voor het andere model niet. Met slechts één model is de verkregen informatie uit de experimenten inderdaad niet volledig extrapoleerbaar naar de complete myocarditis populatie. Dit zal echter voor ons geen reden zijn om de complete studie te stoppen. Als een van de myocarditis-modellen niet geschikt blijkt te zijn om onderzoek te doen naar atriale ontsteking, dan zullen wij op zoek gaan naar een vervangend model waarin we dit mogelijk wel kunnen onderzoeken. Dit zal dan via een addendum aan de CCD worden voorgelegd. In de tussentijd gaan wij wel verder met de experimenten voor het werkende model. Dat de informatie uit het andere model pas later wordt verkregen is hiervoor niet hinderlijk.

Vraag 2) De inductie van EAM vindt plaats door injectie in het pootje. Gaat het hier om injectie in de voetzool of aan de bovenkant van het pootje. Indien het gaat om voetzoolimmunisatie, worden de dieren dan gehuisvest op extra dikke bedding (zoals is aangegeven in de Code of Practice voor immuniseren van proefdieren)?

Antwoord vraag 2) De injectie zal worden gezet in de voetzool. We zullen de bedding van de kooien hierop aanpassen volgens de reglementen.

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 25 april 2016 14:59
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: Vragen over DEC advies AVD114002016513

10.

Beste DEC,

U heeft de CCD een advies gestuurd betreffende aanvraag AVD114002016513, "het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis".

Onze dank voor dit heldere en goed-onderbouwde advies. Wij hebben echter nog wel enkele vragen waarbij we graag nog een verheldering van u krijgen:

1) Citaat uit uw advies: "*Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels.*"

U geeft hier aan dat er nog vragen zijn bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels. Verderop in uw advies gaat u hier niet meer op in. Waren deze vragen opgehelderd op het moment dat u het advies heeft gefinaliseerd of staan deze vragen nog open? In geval dat deze vragen nog open staan, welke vragen zijn dit dan nog?

2) U geeft aan dat het uingebrachte advies niet door alle DEC leden wordt gesteund. U schrijft hierbij: "*Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden,*" Het is ons niet geheel duidelijk wat hiermee bedoeld wordt. Kunt u dit verhelderen?

Graag zouden wij uiterlijk vrijdag 29 april een reactie op bovenstaande vragen ontvangen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven

Van: ██████████
Verzonden: donderdag 28 april 2016 12:57
Aan: Info-zbo
Onderwerp: Re: Vragen over DEC advies AVD114002016513
Categorieën: Dossier ██████████

Geachte CCD,

Hierbij het antwoord van de DEC VU/VUmc op de vragen van de CCD over het DEC-advies betreffende aanvraag AVD114002016513.

Beste DEC,

U heeft de CCD een advies gestuurd betreffende aanvraag AVD114002016513, "het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis".

Onze dank voor dit heldere en goed-onderbouwde advies. Wij hebben echter nog wel enkele vragen waarbij we graag nog een verheldering van u krijgen:

1) Citaat uit uw advies: "*Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels.*"

U geeft hier aan dat er nog vragen zijn bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels. Verderop in uw advies gaat u hier niet meer op in. Waren deze vragen opgehelderd op het moment dat u het advies heeft gefinaliseerd of staan deze vragen nog open? In geval dat deze vragen nog open staan, welke vragen zijn dit dan nog?

Antwoord punt 1: De formulering kon inderdaad wat nauwkeuriger. Na de eerste beantwoording van de vragen waren er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels, dat is in de laatste vraagronde hersteld. Daarbij zijn alle vragen opgehelderd voordat de DEC het DEC-advies had gefinaliseerd.

2) U geeft aan dat het uingebrachte advies niet door alle DEC leden wordt gesteund. U schrijft hierbij: "*Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, ...*" Het is ons niet geheel duidelijk wat hiermee bedoeld wordt. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord punt 2:

In de aanvraag komt naar voren dat: *“Bij het EAM model wordt in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat alle dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal krijgen (circa 30 dieren).” “Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal.”*

De meerderheid van de DEC commissie geeft een positief advies, hierbij heeft men het ernstige ongerief bij de dieren meegenomen in de afweging. Er is 1 DEC lid dat niet meegaat met dit advies, dit lid is van mening dat het ernstige ongerief bij de dieren niet opweegt tegen de belangen van het onderzoek. De IvD heeft de onderzoekers geadviseerd de dieren in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag te controleren, om zo het ernstige ongerief te beperken tot een minimum. Helaas is er geen mogelijkheid om ernstig ongerief geheel te voorkomen, ook niet door meerdere controles per dag (twee of meer) uit te voeren. Het DEC lid dat niet meegaat in het advies is van mening dat omdat het ernstige ongerief/lijden niet voorkomen kan worden (ook niet door de vastgestelde controle momenten) het belang van het onderzoek niet opweegt tegen het ongerief bij de dieren. De IvD zal er tijdens het opstellen van het werkprotocol en het uitvoeren van de experimenten streng op toe zien dat de humane eindpunten duidelijk worden vastgesteld en gehanteerd. Tevens zullen er extra controles plaatsvinden door de 13f functionaris in de gevallen waar kans is op ernstig ongerief.

De DEC VU/VUmc hoopt u op deze manier voldoende informatie te hebben gegeven, mocht er nog meer informatie/toelichting nodig zijn dan horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

██████████ (namens de DEC VU/VUmc)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum

[REDACTED]
deBoelelaan1117
1081 HV AMSTERDAM
[POSTNET]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002016513
Bijlagen
1

23 MEI 2016

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u informatie aangeleverd betreffende doorgang van het project indien één van beide diermodellen niet operationeel zou blijken. Daarnaast heeft u aangegeven de dieren die in de voetzool geïmmuniseerd worden op extra dikke bedding te huisvesten, conform de Code of Practice voor het immuniseren van proefdieren. Deze informatie was voldoende duidelijk en is in de afweging meegenomen.

Beslissing

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De voorwaarde betreffende de afstemming van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in proeven te voorkomen.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2016 tot en met 1 juni 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1 sub d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage. Deze beoordeling achteraf dient plaats te vinden wegens potentieel ernstig ongerief voor een deel van de dieren.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 11 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 28 april 2016 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. Dit betrof verheldering van het DEC advies op het punt van het minderheidsstandpunt en op het punt van mogelijk onbeantwoorde vragen.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Het DEC advies is gebaseerd op een minderheidsstandpunt. De CCD heeft speciale aandacht besteed aan de overweging van het anders denkende DEC-lid. De verwachte opbrengst van het onderzoek rechtvaardigt naar het oordeel van de CCD het gebruik van dieren waarbij voor een deel van de dieren het ongerief ernstig zal zijn.

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD114002016513

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. Of neem
telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Centrale Commissie Dierproeven

na



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: Vrije Universiteit Medisch Centrum
Adres: de Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2016 tot en met 1 juni 2019, voor het project "Het diagnosticeren en behandelen van atriale ontsteking bij myocarditis" met aanvraagnummer AVD114002016513, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum, met toevoeging van algemene voorwaarden.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Post-Doc.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 april 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 11 april 2016, ontvangen op 11 april 2016, aangevuld op 28 april 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 mei 2016.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|------------------------------------|---------------|--------------------------------|---|
| 1. Pilotexperiment | Muizen (Mus musculus) / C3H | 15 | 100% Matig | Acute virale myocarditis model |
| 1. Pilotexperiment | Ratten (Rattus norvegicus) / Lewis | 29 | 14% Ernstig 86% Matig | Experimentele auto-immuun myocarditis model |
| 2. Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) | Muizen (Mus musculus) / C3H | 196 | 100% Matig | Acute virale myocarditis model |
| 2. Biomarkers vaststellen (hoofdexperiment) | Ratten (Rattus norvegicus) / Lewis | 176 | 16% Ernstig 84% Matig | Experimentele auto-immuun myocarditis model |

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk mei 2020 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 de dierproeven conform de vergunning waren.

Algemene voorwaarden:

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

De Minister heeft vrijstelling ontheffing verleend volgens artikel 13c, die de afwijkende methode van doden op basis van wetenschappelijke motivering ten minste even humaan acht als de in de richtlijn opgenomen passende methoden.

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1 sub d 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.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:

2. Titel van het project:

Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis

3. Titel van de NTS:

Het diagnosticeren van atriale ontsteking bij myocarditis

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning*
- wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
- mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: 26-11-2015*
- aanvraag compleet: 26-11-2015*
- in vergadering besproken: 8-12-2015*
- anderszins behandeld: *n.v.t.*
- termijnonderbreking(en) van / tot: *n.v.t.*
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
- aanpassing aanvraag: n.v.t.*
- advies aan CCD: 11-04-2016*

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

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: *14-12-2015, 20-1-2016, 2-2-2016 en 22-02-2016*
- Strekking van de vraag / vragen:

NTS is nog slordig, moet netter en er staan meerder spellingsfouten in de aanvraag. Men moet meer vertellen over de translatie naar de humane situatie. Het wetenschappelijk belang beter toelichten/onderbouwen en de strategie aanpassen. Waarom gebruikt men 2 verschillende modellen?

Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels.

- Datum antwoord: 30-12-2015, 27-1-2016, 15-02-2016 en 09-03-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en):
De gevraagde aanpassingen zijn doorgevoerd en de benodigde toelichting is gegeven.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: *Ja*

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. *Het project is vergunning plichtig. Het omvat dierproeven in de zin der wet.*
2. *De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.*
3. *De DEC is competent om over deze projectvergunningaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijk terrein is aanwezig binnen de DEC.*
4. *Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: één van de DEC-leden is betrokken bij het betreffende project en is niet betrokken geweest bij de advisering.*

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 doelcategorieën (fundamenteel en toegepast onderzoek) zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Myocarditis is een ontstekingsziekte van het myocard ofwel de hartspier. Een veel voorkomende complicatie bij myocarditis patiënten is het ontstaan van atriumfibrilleren (boezemhartritmestoornis). Dit kan grote gevolgen hebben voor de patiënt, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte.

Dit onderzoeksproject heeft als doel het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis. Met dit onderzoek wil men diagnostische biomarkers in het bloed vinden die specifiek zijn voor deze atriale ontsteking.

Het uiteindelijke doel is om bij patiënten met myocarditis atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen. Myocarditis is een brede ziekte is met meerdere onderliggende mechanismen. Bij de meeste patiënten is myocarditis de oorzaak van een acute virale infectie of een auto immuunrespons. Daarom gebruikt men tijdens dit onderzoek twee diermodellen: Het autoimmuun myocarditis (EAM) model en het acute

virale myocarditismodel.

3. De DEC onderschrijft het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van de doelstelling, te weten:

Het wetenschappelijk belang: Er is weinig bekend over het effect van myocarditis op de atria. Door de analyses die men gaat uitvoeren krijgt men meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis.

Het maatschappelijk belang:

Atriumfibrilleren is een zeer lastig te behandelen chronische aandoening wat ernstige gevolgen voor de patiënt kan hebben, zoals plotselinge hartdood, hartfalen of een beroerte. Myocarditis is een van de hartaandoeningen die kan leiden tot atriumfibrilleren.

Deze studie zal bijdragen aan de ontwikkeling van diagnostische biomarkers om atriale ontsteking in myocarditis patiënten te identificeren. Hiermee kan de gevoeligheid voor atriumfibrilleren worden opgespoord en daarna behandeld worden. Dit kan uiteindelijk leiden tot een verlaging van de incidentie van atriumfibrilleren en de daaraan gerelateerde morbiditeit en mortaliteit.

Hoewel er algemene biomarkers zijn die ontsteking kunnen aantonen, kunnen deze niet specifiek aan de atria (hartboezems) worden gekoppeld en zijn dus niet bruikbaar voor het specifiek diagnosticeren van atriale ontsteking. Daarom zijn er nieuwe biomarkers nodig, die wel specifiek zijn voor atriale ontsteking.

4. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Deze eerder gevonden resultaten maken het aannemelijk dat de voorgestelde therapie een gunstig effect zal hebben. Alle technische voorzieningen die benodigd zijn voor uitvoering van het project zijn voorhanden. Binnen de onderzoeksgroep is zowel voldoende deskundigheid als financiering aanwezig om het project succesvol uit te voeren.

Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model), omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. Voor beide modellen gebruikt men mannelijke dieren, omdat mannetjes gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van myocarditis. Uiteindelijk is het wel belangrijk om te bepalen of potentiële diagnostische markers voor atriale ontsteking even gevoelig/specifiek zijn voor mannen als voor vrouwen, maar dit is pas van belang op het moment dat eventueel de overstap wordt gemaakt naar onderzoek bij patiënten.

De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project nieuwe en/of aanvullende inzichten en therapieën zullen worden ontwikkeld. De nieuw verkregen inzichten en

therapieën kunnen op termijn bij patiënten worden toegepast, wat de kansen op remissie en op uiteindelijke genezing doet toenemen. De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC een toetsbare eenheid.

5. *Alle dieren worden gefokt voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren in/uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie/euthanasie zijn conform de Richtlijn.*
6. *Het ongerief als gevolg van de dierproeven is naar de mening van de DEC door de aanvragers realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het verwachte ongerief is over het algemeen matig in beide diermodellen (92%) en voor een klein deel van de dieren (max 8%) verwacht men ernstig ongerief.*

Bij het acute virale myocarditis model wordt voor alle muizen maximaal matig ongerief verwacht.

Bij het EAM model wordt over het algemeen matig ongerief en in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat van alle ratten die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal ondervinden (circa 30 dieren). Voor de overige ratten wordt matig ongerief verwacht.

Onder ernstig ongerief vallen ernstige uiterlijke kenmerken van ongerief en/of een gewichtsafname van meer dan 20% ten opzichte van het startgewicht. Een humaan eindpunt wordt in deze studie bereikt als er ernstig ongerief wordt geconstateerd bij een dier, dan wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd.

7. *Het project is in overeenstemming met de vereisten ten aanzien van de **vervanging** van dierproeven. Het gebruik van proefdiervrije methoden of minder complexe diersoorten is volgens de DEC niet mogelijk.*

Ontstekingsreacties zijn zeer complex, en meerdere orgaansystemen zijn bij dit proces betrokken. Hierdoor is het niet mogelijk ontstekingsreacties na te bootsen met in vitro experimenten. Het onderzoek naar diagnostische markers voor atriale ontsteking kan niet bij mensen worden uitgevoerd, omdat het niet mogelijk is om bij levende myocarditis patiënten zonder atriumfibrilleren aan het weefsel van de atria (hartboezems) te komen.

In dit project wordt daarom gebruikt gemaakt van twee diermodellen, welke de meest frequent voorkomende vormen van myocarditis bij humane patiënten weergeven: autoimmuun myocarditis (EAM) model en acute virale myocarditismodel. Voor de eerste model wordt gebruik gemaakt van een ratmodel met autoimmuun myocarditis (EAM), voor het tweede model zijn geen geschikte rat-modellen, hier maakt men gebruik van een muismodel met acute coxsackievirus B3-geïnduceerde myocarditis. Beide diermodellen zijn goed beschreven en worden wereldwijd gebruikt voor myocarditis. Het toepassen van beide modellen is essentieel, zodat het onderzoek extrapoleerbaar is naar alle patiënten.

8. *In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven.*

Door gebruik te maken van een pilot experiment, het gefaseerd uitvoeren van de

experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel of te weinig dieren worden gebruikt. Het maximale aantal proefdieren, is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd van 3 jaar. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 211 muizen en 205 ratten, en acht dit aantal realistisch onderbouwd.

Men beperkt zich bij het meten tot de tijdstippen waarbij de meeste ontsteking te zien is, hierdoor blijft het aantal dieren dat nodig is voor de experimenten beperkt. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

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.*

Om het ongerief te minimaliseren worden alle handelingen door ervaren/bekwame onderzoekers en diervverzorgers uitgevoerd en waar mogelijk wordt pijnstilling of verdoving toegepast. Om stress te voorkomen worden de dieren na acclimatisatie gegroepeerd gehuisvest onder constante omstandigheden.

De experimenten worden gefaseerd uitgevoerd, eerst wordt een pilot gedaan, om ervoor te zorgen dat er zo weinig mogelijk dieren ernstig ongerief ondervinden. Wanneer er ernstig ongerief wordt geconstateerd is het humane eindpunt bereikt en wordt het experiment beëindigd en worden de betreffende dieren geëuthanaseerd. De dieren zullen dagelijks worden gewogen en beoordeeld op tekenen van ongerief, zodat dieren die op een humaan eindpunt zitten uit de proef kunnen worden gehaald.

Voor het acute virale myocarditismodel gebruikt men een muizenstam die de eigenschap heeft dat de myocarditis een mild ziekteverloop veroorzaakt, waardoor de muizen maximaal matig ongerief zullen ervaren. Bij het EAM model zal maximaal 25% van de dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (circa 30 dieren) ernstig ongerief ondervinden. Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal. Tevens wordt er zo'n klein mogelijk volume ingespoten om de zwelling van de pootjes te beperken.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. *De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. De NTS voldoet daarmee aan de eisen zoals gesteld in artikel 10.a.1.7 van de Wod.*

D. Ethische afweging

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het doel van deze studie is het diagnosticeren van atriale ontsteking (ontsteking van de hartboezems) bij myocarditis.

Het verwachte resultaat, atriumfibrilleren vroegtijdig te kunnen diagnosticeren en behandelen bij patiënten met myocarditis, is afgewogen tegen het, overwegend matige en bij maximaal 30 ratten als ernstige ingeschatte ongerief, aantasting van integriteit en het doden van de dieren in de proef.

Tijdens het onderzoek gebruikt men twee verschillende diermodellen (acute virale myocarditismodel en het EAM model) , omdat met het gebruik van beide modellen een compleet beeld kan worden verkregen voor de totale myocarditis patiëntenpopulatie. De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd.

Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Zowel het wetenschappelijke als het maatschappelijke belang worden door de DEC ingeschat als substantieel. De resultaten zullen bijdragen aan het verkrijgen van meer inzicht in de mechanismen die betrokken zijn bij atriale ontsteking bij myocarditis. Op termijn kunnen de uitkomsten van het project leiden tot betere behandelingsmethoden voor patiënten.

(2) De DEC is van mening dat dit project verantwoord is vanuit wetenschappelijk oogpunt en acht het waarschijnlijk dat de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn wordt behaald. De onderzoekers beschikken over ruime ervaring en kennis op het gebied van de te gebruiken methoden en werken nauw samen met andere onderzoeksgroepen. Dit in combinatie met de beschikbare faciliteiten en infrastructuur betekent dat de onderzoekers goed gekwalificeerd en geoutilleerd zijn voor het uitvoeren van het in dit project beschreven onderzoek.

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 211 muizen en 205 ratten, en het daarbij verwachte overwegend matige en bij maximaal 30 ratten ernstige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen
- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
- ✓ *De DEC adviseert de vergunning te verlenen*

2. *Het uitgebrachte advies is gebaseerd op een meerderheid.*

Eén lid van de DEC maakt een andere afweging, gezien het mogelijk ernstig ongerief voor maximaal dertig dieren. Het lid vraagt zich af of dergelijk ongerief wel kan worden gerechtvaardigd. Lijden is wellicht voor een belangrijke mate diersoort onafhankelijk. Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden, gaat dit lid niet mee in het positieve advies van de commissie.

Hoewel in dit project gebruik van een zwaar ziektemodel onvermijdelijk is, waarbij een belangrijk deel van de dieren mogelijk ernstig ongerief zal ondervinden, acht de DEC dat met het beschreven project belangrijk inzicht gevonden zal worden in het proces van atriale ontsteking bij myocarditis. Bovendien wordt in 2 verschillende modelsystemen naar dit proces gekeken (te weten; viraal en auto-immuun), wat de belangen verder vergroot. Met het behalen van de projectdoelen kunnen duidelijke stappen voorwaarts gezet worden in de ontwikkeling van mogelijke diagnostiek van deze ziekte in de kliniek. De meerderheid van de DEC vindt deze grote wetenschappelijke en maatschappelijke belangen in voldoende mate opwegen tegen de geschade dierenbelangen.

Aanvullend advies van DEC VU/VUmc op de vragen van de CCD over het DEC-advies betreffende aanvraag AVD114002016513.

1) Citaat uit uw advies: *"Vragen over de opzet (strategie), aantallen, het ongerief bij het humaan eindpunt, het gebruik van mannen en vrouwen. Na beantwoording van de vragen zijn er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels."*

U geeft hier aan dat er nog vragen zijn bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels. Verderop in uw advies gaat u hier niet meer op in. Waren deze vragen opgehelderd op het moment dat u het advies heeft gefinaliseerd of staan deze vragen nog open? In geval dat deze vragen nog open staan, welke vragen zijn dit dan nog?

Antwoord punt 1: De formulering kon inderdaad wat nauwkeuriger. Na de eerste beantwoording van de vragen waren er toch nog steeds vragen bij de uitleg van de aantallen dieren en hartweefsels, dat is in de laatste vraagronde hersteld. Daarbij zijn alle vragen opgehelderd voordat de DEC het DEC-advies had gefinaliseerd.

2) U geeft aan dat het uingebrachte advies niet door alle DEC leden wordt gesteund. U schrijft hierbij: *"Mede doordat de voorgestelde controle momenten een beperkende factor vormen voor het voorkomen van ernstig lijden,"* Het is ons niet geheel duidelijk wat hiermee bedoeld wordt. Kunt u dit verhelderen?

Antwoord punt 2:

In de aanvraag komt naar voren dat: *"Bij het EAM model wordt in sommige gevallen ernstig ongerief verwacht. De verwachting is dat alle dieren die langer dan 18 dagen in proef zitten na het induceren van EAM (116 dieren) 25% ernstig ongerief zal krijgen (circa 30 dieren)."* *"Door in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag de dieren te controleren blijft het aantal dieren dat langer dan een halve dag ernstig ongerief ondervind minimaal."*

De meerderheid van de DEC commissie geeft een positief advies, hierbij heeft men het ernstige ongerief bij de dieren meegenomen in de afweging. Er is 1 DEC lid dat niet meegaat met dit advies, dit lid is van mening dat het ernstige ongerief bij de dieren niet opweegt tegen de belangen van het onderzoek. De IvD heeft de onderzoekers geadviseerd de dieren in de periode van 14 tot 25 dagen twee maal per dag te controleren, om zo het ernstige ongerief te beperken tot een minimum. Helaas is er geen mogelijkheid om ernstig ongerief geheel te voorkomen, ook niet door meerdere controles per dag (twee of meer) uit te voeren. Het DEC lid dat niet meegaat in het advies is van mening dat omdat het ernstige ongerief/lieden niet voorkomen kan worden (ook niet door de vastgestelde controle momenten) het belang van het onderzoek niet opweegt tegen het ongerief bij de dieren. De IvD zal er tijdens het opstellen van het werkprotocol en het uitvoeren van de experimenten streng op toe zien dat de humane eindpunten duidelijk worden vastgesteld en gehanteerd. Tevens zullen er extra controles plaatsvinden door de 13f functionaris in de gevallen waar kans is op ernstig ongerief.

De DEC VU/VUmc hoopt u op deze manier voldoende informatie te hebben gegeven, mocht er nog meer informatie/toelichting nodig zijn dan horen wij dat graag.

14 APR. 2016



1.

ARD 107002016514

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.centralecommissiedierproeven.nl 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 | 10700 |
| | | <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 | Universiteit Maastricht |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [Redacted] |
| | | KvK-nummer | 50169181 |
| 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 | Minderbroedersberg 4-6 |
| | | Postbus | 616 |
| | | Postcode en plaats | 6200 MD Maastricht |
| | | IBAN | NL04 INGB 0679 5101 68 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Maastricht |
| 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 | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | | |
| Afdeling | | |
| Telefoonnummer | | |
| E-mailadres | | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het Ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 7 - 2016 |
| Einddatum | 30 - 6 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De ontwikkeling van een kunststof implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------------------------------|
| Naam DEC | DEC-UM |
| Postadres | Postbus 616, 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

| | |
|--------------|--------------|
| Naam | [Redacted] |
| Functie | [Redacted] |
| Plaats | Maastricht |
| Datum | 7 - 4 - 2016 |
| Handtekening | [Redacted] |



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.
- 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.

Kraakbeenletsel wordt in 63% van de artroscopische knie-exploraties gezien [1,2]. Vaak komt dit kraakbeenletsel voor in patiënten van middelbare leeftijd. Kraakbeenhersteloperaties zijn vaak, gezien de beperkte regeneratieve capaciteit in deze leeftijdsgroep, niet succesvol. Ernstig kraakbeenletsel leidt tot de versnelde ontwikkeling van artrose in de knie, leidend tot veel pijn en vaak invaliditeit [3]. De eindstadiumbehandeling van artrose bestaat uit het vervangen van het kniegewricht door een totale knieprothese (TKP). Momenteel ontvangen elk jaar meer dan 20.000 patiënten in Nederland een TKP. Het RIVM heeft berekend dat in 2030, rekening houdend met de verwachte toenemende vergrijzing en obesitas, dit aantal zal stijgen tot ruim 60.000 knieprotheses per jaar. Knieprotheses gaan momenteel echter maar 10-15 jaar mee voordat ze vervangen moeten worden; ongeveer 3% van alle protheses falen jaarlijks doordat deze loslaten of door het falen van componenten. Verder moet ongeveer 1-2% van alle protheses gereviseerd worden vanwege een infectie [3]. Deze revisie operaties (ongeveer 2200 per jaar in Nederland) gaan gepaard met langere operatietijden, langere opnameperiodes, lagere functionele uitkomsten en hogere incidenties van complicaties [4]. Met name de revisie operaties leiden tot een enorme maatschappelijke kostenpost [5], waardoor het van cruciaal belang is om het aantal TKP revisie operaties drastisch te verminderen. De levensduur van de prothese is onder andere sterk afhankelijk van de leeftijd van patiënt bij het plaatsen van de prothese; jongere patiënten zijn actiever waardoor de knieprothese eerder zal slijten en vervangen zal moeten worden. Het is dus van essentieel belang dat de gemiddelde leeftijd waarop een primaire TKP wordt geplaatst wordt verhoogd, om zodoende ook het aantal revisieoperaties populatiebreed drastisch te verminderen. Daarvoor dienen betere behandelingen van kraakbeendefecten ontwikkeld te worden voor patiënten van middelbare leeftijd in het stadium voorafgaand aan artrose.

Op dit moment zijn metalen implantaten de enige keuze voor herstel van kraakbeendefecten in patiënten van middelbare leeftijd. Aangezien de biomechanische eigenschappen van deze metalen implantaten niet overeenkomen met die van kraakbeen, leiden deze implantaten geleidelijk tot meer kraakbeenschade [6,7,8]. Verdere degeneratie van het kraakbeen zal daardoor alsnog tot ernstige artrose leiden, waardoor het vervangen van het kniegewricht door een totale knieprothese als enige optie overblijft. Tevens is na implantatie van deze implantaten diagnostiek middels MRI niet meer mogelijk.

Het doel van dit project is om een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal (bot-kraakbeen) implantaat te ontwikkelen voor de behandeling van kraakbeendefecten. De biomechanische eigenschappen van dit implantaat dienen beter overeen te komen met kraakbeen dan de huidige metalen implantaten, resulterend in een betere klinische uitkomst. Verder moet het materiaal beeldvorming middels MRI toelaten. Het type kunststof dat wordt beoogd voor gebruik [REDACTED] heeft uitstekende eigenschappen met betrekking tot biocompatibiliteit, een hoge vermoeiingssterkte en een hoge slijtvastheid [REDACTED]. Er zijn dus gegronde indicaties dat dit materiaal geschikt is voor toepassing in gewrichten.

Het implantaat zal in contact komen met twee verschillende weefsels; de onderzijde van het implantaat zal worden vastgedrukt in het onderliggende bot terwijl de bovenkant en de zijkanten van de bovenkant contact hebben met het kraakbeen aan de tegenoverliggende gewrichtszijde en het kraakbeen rondom het implantaat.

Beiden aspecten (contact met bot en contact met kraakbeen) vergen optimalisatie waardoor er voor een stapsgewijze proefopzet is gekozen. Voordat de invloed van het te ontwikkelen implantaat op de gezondheid van het kraakbeen op de lange termijn kan worden beoordeeld, dient de middellange termijn fixatie geoptimaliseerd te zijn. Hierbij is het van cruciaal belang dat het implantaat integreert in het subchondrale bot zonder fibreuse tussenlaag. Hiervoor is actieve in- een aangroei van bot noodzakelijk, hetgeen alleen *in vivo* kan worden beoordeeld. Er zijn verschillende manieren om actieve in- en aangroei van bot te stimuleren. Dit kan door het implantaat te bedekken met een coating aan het oppervlakte of door het aanbrengen van kanalen of poriën in de structuur waardoor het implantaat volledig kan integreren met omringende bot. Daarom zal allereerst de integratie met het onderliggende bot beoordeeld worden voor implantaten met verschillende coatings en poriëmaten.

De invloed van poriematen is eerder bestudeerd voor titanium implantaten [13], echter is dit nog niet eerder gedaan voor kunststof implantaten. Vanwege een groot verschil in de stijfheid (200 MPa versus 200 GPa) kunnen deze resultaten niet zomaar getransleerd worden naar kunststof implantaten. Verder zijn er verschillende manieren van coaten bekend om polymerische implantaten osteoinductief te maken:

[REDACTED] De invloed van het varieëren van de porie-maat en coating op de osteointegratie van een kunststof implantaat zal worden bestudeerd in de eerste fase, waarbij vier verschillende combinaties van deze factoren worden bestudeerd. Een titanium controle groep zal hierbij worden meegenomen. Voorafgaand aan deze fase zal een voorselectie van kandidaat coatings en porie-maten worden gemaakt door middel van *in vitro* onderzoek.

De twee implantaten die het meest geschikt blijken in fase 1 zullen worden bestudeerd in een lange termijn effectiviteitsstudie waarbij de huidige standaard, de metalen implantaten, en een sham geopereerde groep dieren worden meegenomen. De belangrijkste uitkomstparameter in de tweede studie is de lange termijn gezondheid van het omringende en overstaande kraakbeen. Dit zal worden beoordeeld door middel van histopathologische scoringssystemen.

1. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 1997 Aug;13(4):456-60. PubMed PMID: 9276052.
2. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2002 Sep;18(7):730-4. PubMed PMID: 12209430.
3. Crema, M.D., et al., *Progression of cartilage damage and meniscal pathology over 30 months is associated with an increase in radiographic tibiofemoral joint space narrowing in persons with knee OA--the MOST study*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014. **22**(10): p. 1743-7.
4. Ritter MA, Carr KD, Keating EM, Faris PN, Bankoff DL, Ireland PM. Revision total joint arthroplasty: does medicare reimbursement justify time spent? *Orthopedics*. 1996 Feb;19(2):137-9. PubMed PMID: 8834288.
5. Lavernia C, Lee DJ, Hernandez VH. The increasing financial burden of knee revision surgery in the United States. *Clinical orthopaedics and related research*. 2006 May;446:221-6. PubMed PMID: 16672891.
6. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar;18(3):377-88.
7. Custers RJ, Saris DB, Dhert WJ, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Articular cartilage degeneration following the treatment of focal cartilage defects with ceramic metal implants and compared with microfracture. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Apr;91(4):900-10.
8. Laursen JO, Lind M. Treatment of full-thickness femoral cartilage lesions using condyle resurfacing prosthesis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2015 Jul 29. [Epub ahead of print]

13. Taniguchi N, Fujibayashi S, Takemoto M, Sasaki K, Otsuki B, Nakamura T, Matsushita T, Kokubo T, Matsuda S. Effect of pore size on bone ingrowth into porous titanium implants fabricated by additive manufacturing: An in vivo experiment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Feb 1;59:690-701.

14. [REDACTED]

15.

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 dit project is het ontwikkelen en het preklinisch testen van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat, waarvan de biomechanische eigenschappen overeenkomen met die van kraakbeen.

Allereerst dient dit implantaat voldoende gefixeerd te blijven in het subchondrale bot (bot onder het kraakbeen). Het eerste doel is identificatie van de implantaatvariant (combinatie van implantaat porie-maat en coating) waarmee bot in- en aangroei optimaal wordt gestimuleerd om zodoende een optimale middellange termijn fixatie te verkrijgen. Het tweede doel is het aantonen van de effectiviteit van dit implantaat; hierbij zal worden gekeken naar de gezondheid van het kraakbeen na een periode van 26 of 52 weken na het inbrengen van het implantaat.

De gestelde doelen lijken haalbaar gezien eerdere toepassingen van het materiaal binnen gewrichtsoperaties in preklinische dierenmodellen en ook klinisch bij patiënten. De te evalueren coatings zijn eerder bestudeerd in combinatie met metalen implantaten in andere lichaamsdelen. In verschillende omstandigheden bleken de coatings bot aangroei te stimuleren. Naar verwachting zal de translatie naar een ander implantaat materiaal (kunststof in plaats van metaal) en een andere lichaamsdeel (bot binnen het gewricht in plaats van lange botten) geen effect hebben op de functionaliteit van de verschillende coatings. De praktische uitvoering van het project is ook haalbaar, gezien alle voorradige faciliteiten inclusief operatiekamers, faciliteiten voor het uitvoeren van PET-CT scans, ervaren orthopedische chirurgen en huisvestingsruimtes.

3.3 Belang

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

Kraakdefecten op jonge leeftijd geven een grote kans op artrose op latere leeftijd. Bij jonge patiënten worden regeneratieve technieken veelvuldig en succesvol gebruikt voor de behandeling van kraakbeedefecten. Het succes van regeneratieve (stamcel) technieken daalt met toenemende leeftijd [1]. Als regel worden daarom regeneratieve technieken niet meer toegepast bij patiënten boven de 40 jaar oud. Voor deze patiënten zijn metalen implantaten beschikbaar [2]. Het is echter gebleken dat metalen implantaten leiden tot degeneratie van het tegenoverstaande kraakbeen en patiënten last blijven houden van pijn, beiden vermoedelijk als gevolg van een lokale verhoogde mechanische belasting. Dit noodzaakt relatief vaak (23-28% na 2 jaar) revisie chirurgie waarbij alsnog op zeer jonge leeftijd een hemi- of totale knieprothese wordt geplaatst [3-4]. De stijfheid van het kunststof van het nieuwe implantaat komt dicht in de buurt van de stijfheid van kraakbeen [5] terwijl de stijfheid van metaal typisch een factor 200,000 hoger is dan kraakbeen (200 GPa versus 1 MPa) [5]. Vermoedelijk zal dit verschil in stijfheid leiden tot een hogere overlevingsduur van het nieuwe implantaat en tot betere klinische resultaten.

1. Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR, et al. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger? *Arthroscopy*. 2006;22:1180-6.
2. Bollars P, Bosquet M, Vandekerckhove B, Hardeman F, Bellemans J. Prosthetic inlay resurfacing for the treatment of focal, full thickness cartilage defects of the femoral condyle: a bridge between

biologics and conventional arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2012 Sep; 20(9): 1753-9.2

3. Laursen JO, Lind M. Treatment of full-thickness femoral cartilage lesions using condyle resurfacing prosthesis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Jul 29. [Epub ahead of print]
4. Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry (2013) Annual report
5. Mansour, JOSEPH M. "Biomechanics of cartilage." *Kinesiology: the mechanics and pathomechanics of human movement* (2003): 66-79.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van dit project is het ontwikkelen en het preklinisch testen van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat, waarvan de biomechanische eigenschappen overeenkomen met die van kraakbeen.

Initiële fixatie zal voordat er met dierproeven wordt begonnen worden beoordeeld in (dierlijke) kadaver knieën. Zo zal uitvoerig bestudeerd worden welke diameter het geboorde gat moet hebben voor optimale fixatie van een press-fit implantaat. Verder zal gebruik worden gemaakt van een universele gewrichten testmachine om de fysiologische belasting van de (kadaver) knie na te bootsen. Hierdoor zal de chirurgische techniek worden geoefend en zal de volledige korte termijn stabilisatie van het implantaat in kaart kunnen worden gebracht voordat er dierenproeven worden uitgevoerd. De kans op vroege loslating, met falen van het experiment als gevolg, zal daardoor tot een minimum worden beperkt.

Verder zal een grote variatie aan implantaat stukken met combinaties van verschillende coatings en poriematen worden gescreend op botceladhesie en osteoinductie in verschillende *in vitro* modellen. Op deze manier zal er een voorselectie met betrekking tot de soort coating en de porositeit van het implantaat worden gemaakt.

Vier verschillende experimentele implantaten zullen worden ingebracht in de knie van de geit. Na 12 weken zullen de dieren worden opgeofferd en zal de integratie van het implantaat met het bot worden beoordeeld door middel van histopathologie en/of hoge resolutie CT (microCT).

Nadat de optimale manier van fixatie en integratie met het onderliggende bot is ontwikkeld, dient de klinische effectiviteit op lange termijn bestudeerd te worden. In theorie zou het implantaat het aanliggende kraakbeen moeten beschermen tegen verdere beschadiging en tegelijkertijd mag het implantaat niet leiden tot verslechtering van de staat van het tegenoverliggende kraakbeen. Zesentwintig en 52 weken na implantatie zullen de dieren worden opgeofferd en zal de gezondheid van het kraakbeen worden geevalueerd via een histopathologisch scoringssysteem.

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

De twee hoofdlijnen van dit onderzoek zijn: (1) bepalen van de oppervlaktebehandeling (combinatie van coating en poriemaat) die leidt tot de optimale fixatie en integratie van het implantaat in het subchondrale bot en (2) bepalen van de mate waarin het implantaat het aangrenzende kraakbeen beschermt tegen verdere beschadiging.

Voor de eerste hoofdlijn zal een middellange termijn dierproef (12 weken) worden uitgevoerd met als primaire uitkomst de mate van osteointegratie (integratie met het subchondrale bot) van verschillende variaties van het implantaat. Voor de tweede hoofdlijn zal een lange termijn dierproef (26 en 52 weken) worden uitgevoerd, waarin de conditie van het aangrenzende kraakbeen na het inbrengen van het te ontwikkelen implantaat zal worden vergeleken met de gezondheid van het aangrenzende kraakbeen na het inbrengen van metalen implantaten, hetgeen de huidige standaard is. Beiden dierenproeven zullen worden uitgevoerd in geiten. De geit is een veelvuldig gebruikt dierenmodel voor het bestuderen van

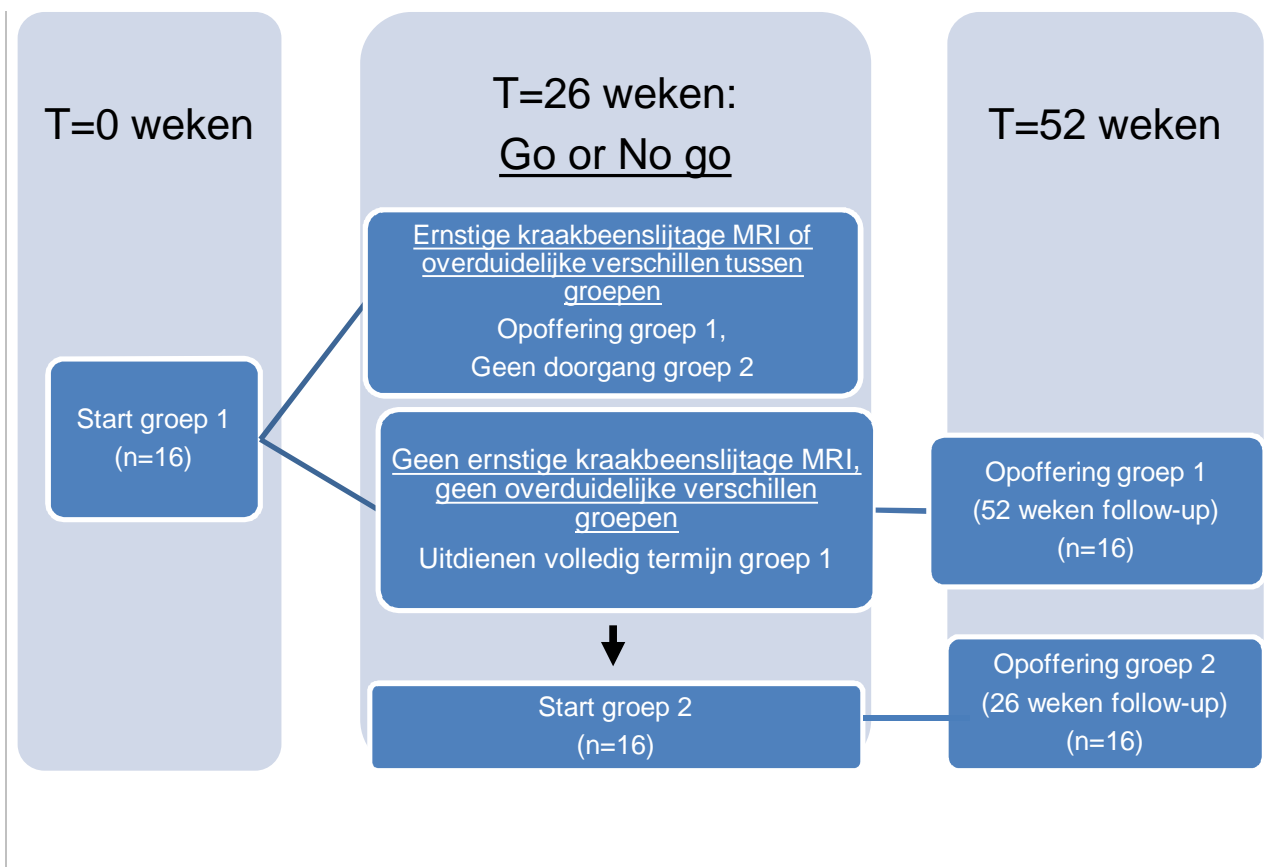
technieken ter behandelings van kraakbeendefecten in de knie [1,2]. De dikte van de kraakbeenlaag, de dikte van de subchondrale botlaag en de verhouding tussen beiden komen het dichtst in de buurt van de mens, waardoor het geitenmodel het meest geschikte model is voor beiden dierproeven binnen dit project.

1. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 705–13.
2. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2010; 16: 105–15.

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 eerste hoofdlijn heeft als doel de implantaatvariant (combinatie van implantaat porie-maat en coating) te identificeren waarmee bot in- en aangroei optimaal wordt gestimuleerd om zodoende een optimale middellange termijn fixatie te verkrijgen. In deze fase zullen vier implantaten met verschillende combinaties van coating en poriematen worden getest en met elkaar worden vergeleken; twee verschillende coatings en een grove en fijnere poriemaat. Hierbij zal ook een controle groep, bestaande uit metalen implantaten worden meegenomen. Uit deze eerste fase zullen maximaal twee implantaatontwerpen voortvloeien die zullen worden beoordeeld op klinische effectiviteit in fase 2. De twee implantaten waarvan het hoogste implantaat oppervlakte percentage is bedekt met bot, waarbij een ondergrens wordt gesteld, zullen voortvloeien naar fase 2.

De tweede hoofdlijn heeft als doel het te ontwikkelen implantaat te beoordelen op de klinische effectiviteit met als belangrijkste uitkomstparameter de mate waarin het implantaat het aangrenzende kraakbeen beschermt tegen verdere degeneratie. Hierbij zullen dieren op twee verschillende tijdstippen worden opgeofferd (26 en 52 weken) om onderscheid te kunnen maken tussen late en vroege kraakbeenschade. De 52 weken groep zal eerst worden ingezet en bij deze dieren zal na 26 weken een MRI scan van de kniegewrichten worden gemaakt. Bij constatering van zeer ernstige, dehabiliterende kraakbeenslijtage of overduidelijke verschillen tussen implantaatgroepen op basis van de MRI beelden zullen de dieren op dit moment worden opgeofferd (26 weken). Indien dit het geval is, zal verder histopathologisch onderzoek plaatsvinden, waardoor het beoordelend vermogen wordt vergroot. Indien blijkt dat het projectdoel al kan worden bereikt op basis van de histopathologische onderzoeken afkomstig van dit tijdstip, zal de tweede groep dieren niet meer worden ingezet. Indien er geen sprake is van zeer ernstige kraakbeenslijtage of er geen duidelijke verschillen tussen de groepen waarneembaar zijn op de MRI beelden, zullen deze dieren pas na 52 weken worden opgeofferd en zal de tweede groep dieren (opoffering 26 weken) worden ingezet. Het nieuwe kunststof osteochondraal implantaat zal vergeleken worden met de huidige standaard (metalen implantaten) en met een sham geopereerde groep.



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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Geitenstudie: Het effect van oppervlakte structuur en coating op de osteointegratie van een kunststof implantaat ter behandeling van kraakbeendefecten in de knie |
| 2 | Geitenstudie: Het lange termijn effect van een kunststof implantaat ter behandeling van kraakbeendefecten op de gezondheid van aan- en omliggend kraakbeen in de knie |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |
| 10 | |



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | |
|---|-------------------------|--|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10700 | |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Maastricht | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | Volgnummer | Type dierproef |
| | 1 | Geitenstudie: Het effect van oppervlaktestructuur en coating op de osteointegratie van een kunststof implantaat ter behandeling van kraakbeendefecten in de knie |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vier verschillende kunststof kraakbeenimplantaten met verschillende combinaties van coating en poriemaat en één controle metalen implantaat zullen bilateraal worden geïmplantéerd in de knie van skeletair volwassen geiten (> 1.5 jaar oud). De primaire uitkomstparameter is de mate van integratie van het implantaat met het omliggende bot, gekwantificeerd door het percentage van het implantaatoppervlak in direct contact met bot te beoordelen door gebruik van zowel beeldvormende (microCT) als histopathologische technieken.

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 osteochondraal implantaat zal operatief worden ingebracht in beide knieën van de geit. Na een artrotomie zal een cilindervormig gat van gecontroleerde diepte worden geboord door het kraakbeen tot in het subchondrale bot. Het implantaat zal via press-fit vast worden gedrukt in het onderliggende bot. De geboorde cilinder zal daarom iets smaller zijn dan het implantaat voor voldoende fixatie. De dieren zullen op basis van ervaringen met soortgelijke implantaten weinig tot geen last hebben van deze procedure en het implantaat, waardoor het implantaat in beide knieën zal worden geplaatst [1,2]. Op deze manier zullen beide implantaten volledig worden belast. In de eerste week postoperatief zullen de dieren worden gehuisvest in bewegingsbeperkende ruimten om zodoende gecontroleerde belasting op het implantaat toe te laten. Na 2 weken zal de positie van het implantaat door middel van een röntgenfoto worden gecontroleerd onder lichte sedatie en zullen de hechtingen worden verwijderd

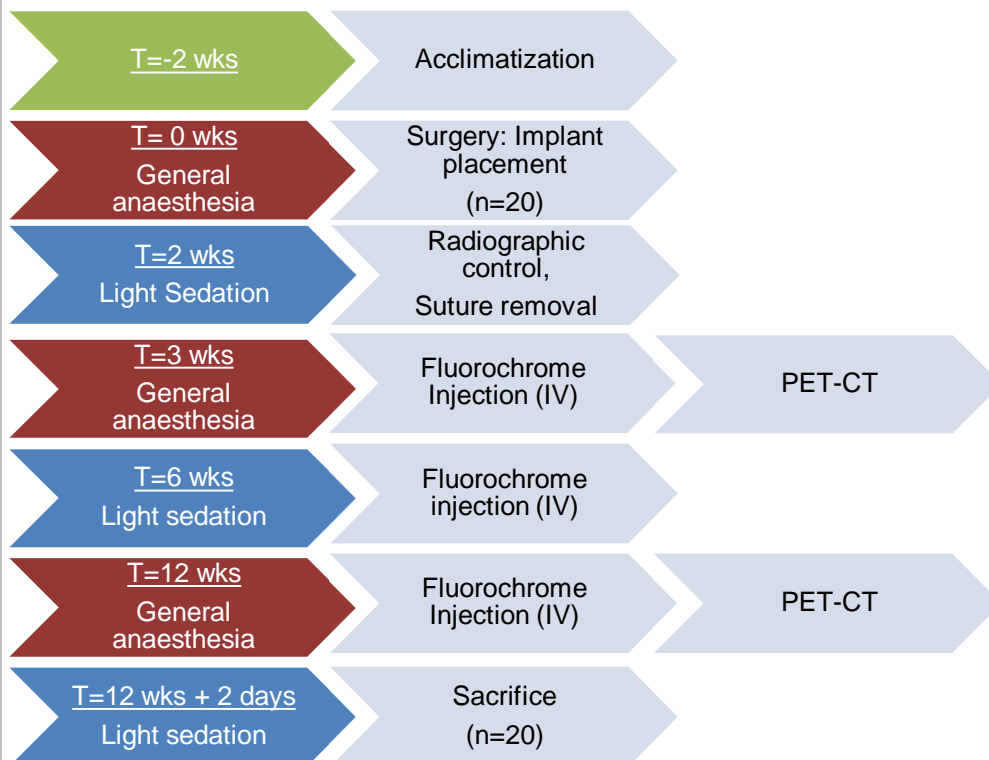
Op drie tijdstippen worden fluorochrome labels intraveneus toegediend onder lichte sedatie danwel volledige narcose (alleen wanneer de injectie wordt gecombineerd met een PET-CT-scan, zie vervolg). Deze fluorochrome labels circuleren ongeveer 24-36 uur in het lichaam en worden ingebouwd in het bot waar op dat moment mineralisatie plaats vindt. Door middel van fluorescente belichting kan op die manier na opoffering een tijdslijn in de histopathologische coupes van het bot worden gevisualiseerd die het incorporatieproces van de fluorochrome labels en dus osteointegratie weergeven. Fluorochrome labeling is een veel gebruikte en efficiënte manier om botmetabolisme op verschillende tijdstippen in een levend dier te meten [3].

Op twee tijdstippen zullen de dieren een PET-CT scan ondergaan onder volledige narcose. Hiervoor zal een ^{18}F -Fluoride tracer intraveneus worden toegediend. Deze tracer geeft een indicatie van het botmetabolisme rondom het implantaat en biedt potentiële mogelijkheden voor vroegtijdige diagnostisering van falende implantaten in de kliniek in de toekomst [4]. Binnen deze studie zal worden onderzocht of het PET-CT beeld correleert met botaanmaak en stabiliteit van het implantaat, zoals achteraf zal worden beoordeeld op basis van histopathologische technieken.

Enkele dagen na de PET-CT scan op 12 weken zullen de dieren worden geëuthaniseerd. Er is gekozen voor enkele dagen tussen de PET-CT scan en euthansie om volledig verval van de radioactieve tracer op te laten treden om te voorkomen dat mensen in contact komen met mogelijk radioactief besmet materiaal.

1. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar;18(3):377-88.
2. Leng P, Wang YZ, Zhang HN. Repair of large osteochondral defects with mix-mosaicplasty in a goat model. *Orthopedics*. 2013 Mar;36(3):e331-6.
3. van Gaalen SM, Kruyt MC, Geuze RE, de Bruijn JD, Alblas J, Dhert WJ. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010 Apr;16(2):209-17
4. Peters M, Willems P, Weijers R, Wierth R, Jutten L, Urbach C, Arts C, van Rhijn L, Brans B. Pseudarthrosis after lumbar spinal fusion: the role of ^{18}F -fluoride PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2015 Nov;42(12):1891-8.

Tijdslijn osteointegratiestudie



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

Implantaten zullen bilateraal worden geïmplanteerd in de knie (twee implantaten per dier) om het benodigde aantal dieren tot een minimum te beperken.

Om het aantal benodigde proefdieren te bepalen is een berekening gedaan om de groepsgrootte te bepalen. De belangrijkste uitkomstmaat is het percentage van het implantaat dat direct in contact is met bot. Vergelijkbare studies leveren een indicatie voor de spreiding en de effectgrootte [1].

1. Custers RJ, Dhert WJ, van Rijen MH, Verbout AJ, Creemers LB, Saris DB. Articular damage caused by metal plugs in a rabbit model for treatment of localized cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 Aug; 15(8):937-45.

B. De dieren

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

Vrouwelijke geiten zullen worden gebruikt voor deze studie omdat deze vanwege de commerciële houderijsystemen veel makkelijker te verkrijgen zijn en omdat vrouwelijke geiten binnen één groep kunnen worden gehuisvest [1]. Het gebruik van alleen vrouwelijke dieren zal naar verwachting geen invloed hebben op de resultaten van de studie en de belasting van de knie (de belangrijkste factor van invloed op de uitkomstmaten). **Het gebruik van alleen vrouwelijke dieren is een veelvuldig gemaakte- en breed geaccepteerde keuze in preklinische studies naar verschillende kraakbeenherstel technieken [2-5].**

Er is gekozen voor een grote diersoort omdat er een implantaat wordt getest dat is ontworpen voor humaan gebruik; het implantaat moet passen in het te testen gewricht. Er is gekozen voor geiten omdat de anatomie van de geitenknie gelijkenis toont met de humane knie [6] en omdat de dikte van het kraakbeen het dichtst in de buurt komt bij die van de mens [6,7]. In studies waarbij andere osteochondrale implantaten (veelal resorbeerbare implantaten of metalen implantaten) worden getest, wordt ook veelvuldig gebruik gemaakt van de geit [6-8]. De dieren dienen skeletair volwassen te zijn (>1.5 jaar). De voorkeur gaat meteen ook uit naar geiten van 1.5-2 jaar oud, omdat geiten van nature slijtage van het kraakbeen vertonen en dat erger wordt met toenemende leeftijd.

Vijf groepen (vier varianten van het kunststof implantaat en één groep metalen implantaten) bestaande uit elk 8 implantaten zullen worden geïncludeerd in deze studie (8x5=40 kniën, inclusief mogelijke uitval). Omdat de implantaten bilateraal (2 kniën per geit) worden geïmplanteerd, zal het aantal 20 dieren bedragen (40 kniën/2=20 dieren).

1. Fulton LK, Clarke MS, Farris HE, Farm Animals in Biomedical Research-Part Two: The Goat as a Model for Biomedical Research and Teaching *ILAR J* (1994) 36 (2): 21-29 doi:10.1093/ilar.36.2.21
2. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar; 18(3): 377-88
3. Vrancken AC, Madej W, Hannink G, Verdonschot N, van Tienen TG, Buma P. Short Term Evaluation of an Anatomically Shaped Polycarbonate Urethane Total Meniscus Replacement in a Goat Model. *PLoS One*. 2015 Jul 20; 10(7):e0133138.
4. Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP, Mainil-Varlet P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Dec; 14(12):1214-26. Epub 2006 Jul 3.
5. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am*. 2001 Jan; 83-A(1):53-64.
6. Kon E, Filardo G, Shani J, Altschuler N, Levy A, Zaslav K, Eisman JE, Robinson D. Osteochondral regeneration with a novel aragonite-hyaluronate biphasic scaffold: up to 12-month follow-up study in a goat model. *J Orthop Surg Res*. 2015 May 28; 10:81. doi: 10.1186/s13018-015-0211-y.
7. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, Mainil-Varlet P, McIlwraith CW, Sah RL, Whiteside RA. Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage*. 2011 Apr; 2(2):137-52.
8. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009; 17: 705-13.

9. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16: 105–15.

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: Initiële fixatie zal vantevoren worden beoordeeld in (dierlijke) kadaver knieën. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een universele gewichten testmachine. Dit apparaat zal worden gebruikt om fysiologische belasting van de (kadaver-) knie na te bootsen.

Hierdoor zal de volledige korte termijn stabilisatie van het implantaat in kaart kunnen worden gebracht voordat er dierenproeven worden uitgevoerd. De kans op vroege loslating, met falen van het experiment als gevolg, zal daardoor tot een minimum worden beperkt. Verder zal een grote variatie aan implantaatstukken met combinaties van verschillende coatings en poriematen worden gescreend op botceladhesie en osteoinductie in verschillende *in vitro* modellen. Op deze manier zal er een voorselectie met betrekking tot de soort coating en de porositeit van het implantaat worden gemaakt.

Vermindering: Implantaten zullen bilateraal operatief worden geplaatst. Dit zal leiden tot een halvering van het benodigde aantal dieren. Het bilateraal plaatsen van implantaten ter behandeling van kraakbeen defecten is eerder gedaan met soortgelijke osteochondrale implantaten [1,2] waardoor deze aanpak is gerechtvaardigd. Adequate anaesthesie en analgesie protocollen zullen worden samengesteld in overleg met een veterinaire anaesthesioloog om pijn zoveel mogelijk te verminderen. Het postoperatieve beleid is erop gericht om dieren zo snel mogelijk weer ambulante te krijgen, met minimale ervaring van stress. Combinaties van verschillende implantaten in de linker en rechter knieën zullen worden gevarieerd om potentiële bias te voorkomen.

Verfijning: Door het injecteren van fluorochrome labels op verschillende tijdstippen is het mogelijk de staat van botaanmaak of remodelering op deze momenten achteraf te visualiseren. Dit geeft inzicht in het proces van osteointegratie in de loop van de tijd, zonder dat er dieren op tussentijden opgeofferd dienen te worden. Er is gekozen voor een grote diersoort in plaats van een lagere diersoort zoals een konijn omdat kleine diersoorten over een grotere intrinsieke reparatiecapaciteit van kraakbeen beschikken en omdat de anatomie en mechanische belasting in de knie moeilijker te vergelijken is met de mens [3-5]. Tevens kan een kleine diersoort zoals een konijn een vertekend beeld van de resultaten geven daar het implantaat zo goed als gelijk moet liggen met het omliggende kraakbeen en bij een klein dier met een dunne laag kraakbeen dus sneller relatief grote fouten worden gemaakt.

1. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Mar; 18(3): 377-88.
2. Leng P, Wang YZ, Zhang HN. Repair of large osteochondral defects with mix-mosaicplasty in a goat

model. Orthopedics. 2013 Mar; 36(3):e331-6.

3. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, Mainil-Varlet P, McIlwraith CW, Sah RL, Whiteside RA. Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. Cartilage. 2011 Apr; 2(2):137-52.
4. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. Osteoarthritis Cartilage 2009; 17: 705–13.
5. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. Tissue Eng Part B Rev 2010; 16: 105–15.

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.

Dieren zullen buiten de postoperatieve fase in groepen worden gehuisvest uit sociaal oogpunt om zodoende angst en eenzaamheid tot een minimum te beperken. De dieren zullen protocollair worden voorbereid, geopereerd en postoperatief worden nabehandeld. Anaesthesie, peroperatieve pijnbestrijding, antibiotica en postoperatieve analgetica zullen daarbij lege artis worden toegepast.

Na de operatie worden de dieren niet door middel van een spalk of sling beperkt in mobiliteit. Dieren zullen de eerste weken na de operatie wel individueel (of samen met andere net geopereerde geiten) worden gehuisvest in een beperkte ruimte om geleidelijk aan beweging toe te laten. Tijdens deze periode zal de bedding eventueel worden aangepast naar behoefte. Individueel gehuisveste dieren zullen in dezelfde ruimte en naast andere geiten verblijven (in direct contact) uit sociaal oogpunt. Dieren zullen direct worden terug geplaatst in de groep wanneer ze volledig ambulant zijn zonder claudicatie.

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.

Het implantaat dat zal worden getest is een uniek en nieuw ontwikkeld implantaat, waarmee nog geen eerdere dierenproeven uitgevoerd zijn geweest.

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.

Individuele huisvesting (of huisvesting in paren) zal plaats vinden na de operatie zodat dieren voorzichtig weer gaan bewegen. De geiten zullen in dezelfde ruimte en naast andere geiten (in direct contact) verblijven uit sociaal oogpunt. Dieren zullen direct worden terug geplaatst in de groep wanneer ze volledig ambulant zijn zonder claudicatie.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Peri- en postoperatief (minimaal drie dagen) zal pijnstilling worden toegediend. De dieren moeten volledig zelfstandig ambuland zijn voordat de pijnstilling zal worden gestopt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Loslating van het implantaat of afstoting door het lichaam kan optreden.
Postoperatieve wondinfectie blijft een risico na elke chirurgische ingreep.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Mogelijke oorzaken van postoperatieve wondinfectie zijn: niet geheel steriel werken, niet voldoende steriel afdekken of onvoldoende prepareren van het chirurgische gebied en steriele materialen die niet aan de eisen voldoen. Loslating van het implantaat kan optreden vanwege mechanisch falen, implantaatinfectie leidend tot osteomyelitis met botresorptie danwel afstoting van het lichaam.

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

Profylactische antibiotica zal pre- en postoperatief worden toegediend. Strikte maatregelen zullen worden genomen om de steriliteit tijdens de procedure te waarborgen. Eventueel zal de wond postoperatief worden afgedekt met een jodiumfilm om contaminatie na de operatie te voorkomen. Een ervaren orthopedische chirurg (kniespecialist) met tevens chirurgische ervaring in geiten zal de operaties uitvoeren.

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.

Niet belasten van de poot of blijvende claudicatie ondanks analgesie zijn de meest voor de hand liggende complicaties. Dit kan leiden tot spieratrofie. Loslating van het implantaat (evt door afstoting) kan hier een oorzaak van zijn. Blijvende claudicatie wordt derhalve beschouwd als humaan eindpunt.

Postoperatieve wondinfectie, leidend tot volledige gewrichtsontsteking en algehele malaise die niet onder controle is te krijgen door middel van antibiotica toediening, wordt ook beschouwd als humaan eindpunt.

Langdurige postoperative zwakte, waarbij het dier niet zelfstandig kan staan.

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

Niet belasten van de poot of blijvende claudicatie wordt niet vaak beschreven in de literatuur bij vergelijkbare studies. Omdat dit een nieuw te ontwikkelen implantaat betreft, wordt voor de zekerheid een kans van 5% aangehouden.

Minder dan 1% van de patiënten loopt kans op een postoperative infectie na autologe kraakbeen transplantatie, een ingreep die vergelijkbaar is met deze proef qua invasiviteit en duur [1]. In één studie beschreven door Saw et al. [2], ontwikkelde 1 van de 15 geiten (6.7%) een postoperatieve infectie in de knie. In vele andere soortgelijke studies bij geiten worden echter geen infecties gemeld. Daaruit concluderen we dat kans op infecties bij geiten na kraakbeen operaties soortgelijk is als bij de mens. De kans op langdurige postoperative zwakte lijkt zeer beperkt. De kans op optreden van een van deze beide complicaties wordt op 5% geschat.

1. Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Jul; 19(7): 779-91.
2. Saw KY, Hussin P, Loke SC, Azam M, Chen HC, Tay YG, Low S, Wallin KL, Ragavanaidu K. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. *Arthroscopy*. 2009 Dec; 25(12): 1391-400.

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.

De dieren zullen eenmalig een operatieve ingreep ondergaan, waarvoor ze onder algehele anaesthesie worden gebracht. Het onder anaesthesie brengen en ontwaken hieruit kan tot enige vorm van stress leiden. De operatieve ingreep kan leiden tot moeilijke ambulantie, hetgeen stress en pijn kan veroorzaken. Om vroege loslating te voorkomen zullen de dieren de eerste dagen na de operatie individueel of in paren worden gehuisvest. Gedurende deze periode zullen herstellende dieren wel in direct contact blijven met andere geiten en zullen de dieren direct worden terug geplaatst in de groep zodra ze volledig ambulant zijn zonder claudicatie.

Verder zullen dieren nog tweemaal onder algehele anaesthesie worden gebracht om het uitvoeren van een PET-CT-scan mogelijk te maken. Dit kan wederom leiden tot enige vorm van stress tijdens het narcotiseren of de ontwaking uit narcose. Ten tijde van deze volledige narcose zullen de dieren via een intraveneuze injectie de fluorochrome labels krijgen toegediend. Eenmalig, wanneer er geen PET-CT wordt gemaakt, zal een dergelijke injectie worden gedaan onder lichte sedatie.

Uiteindelijk classificeren we het totaal ongerief als matig, vanwege de mogelijke pijn en stress.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De belangrijkste uitkomstparameter is de mate van integratie van het implantaat met het onderliggende en omringende bot en zal gekwantificeerd worden op basis van histopathologische scoringsysteem. Hiervoor is het noodzakelijk om het dier te euthaniseren.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| | | |
|---|-------------------------|--|
| 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 10700 | |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Maastricht | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | Volgnummer | Type dierproef |
| | 2 | Geitenstudie: Het effect van een kunststof implantaat ter behandeling van kraakbeendefecten op de gezondheid van aan- en tegenoverliggende kraakbeen op lange termijn in de knie |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

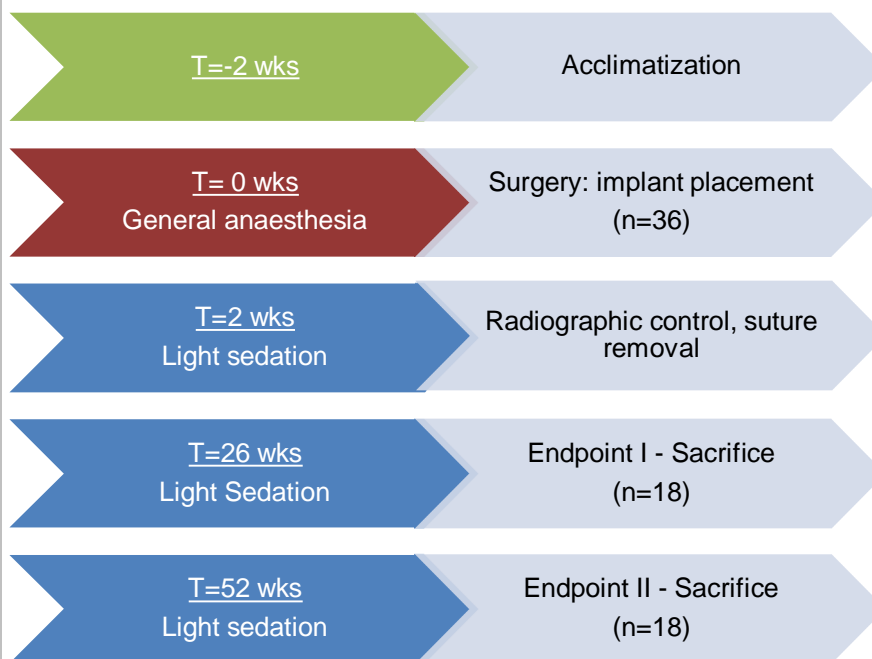
Verschillende kunststof implantaten ter behandeling van kraakbeendefecten in de knie zullen bilateraal worden geïmplanteerd in de mediale zijden van skeletair volwassen geitenknieën (> 1.5 jaar oud). Een groep met de huidige standaard, metalen implantaten, en een sham geopereerde groep zullen worden meegenomen als controlegroepen. De primaire uitkomstparameter is de conditie van het tegenoverliggende en aanliggende kraakbeen op twee tijdstippen. De gezondheid van het kraakbeen zal worden gescoord op basis van zowel beeldvormende (MRI) als histopathologische technieken, met de histopathologische scores als belangrijkste uitkomstmaat (volgens het OsteoArthritis Research Society International (OARSI) Cartilage Histopathological Assessment System (OOCHAS) volgens Pritzker et al. 2006). Klinische parameters zoals pijn en beweeglijkheid zijn moeilijk te beoordelen in de geit en hier zijn geen gevalideerde scoringssystemen voor, waardoor dit geen primaire uitkomstmaten zijn.

1. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006 Jan; 14(1): 13-29.

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 osteochondraal implantaat zal operatief worden ingebracht in beide knieën van de geit. Na een

artrotomie zal een cilindervormig gat van gecontroleerde diepte worden geboord door het kraakbeen heen tot in het subchondrale bot. Het implantaat zal middels press-fit in het bot worden vastgedrukt. Het geboorde gat zal iets smaller zijn dan het implantaat voor voldoende fixatie. De dieren zullen op basis van ervaringen met soortgelijke implantaten weinig tot geen last hebben van deze procedure en het implantaat, waardoor het implantaat in beide knieën zal worden geplaatst [1,2]. Op deze manier wordt er ook gegarandeerd dat de implantaten volledig worden belast. In de eerste week postoperatief zullen de dieren worden gehuisvestigd in bewegingsbeperkende ruimten om zodoende gecontroleerde belasting op het implantaat toe te laten. Na 2 weken zal de positie van het implantaat door middel van een röntgenfoto worden gecontroleerd onder lichte sedatie en zullen de hechtingen worden verwijderd. Een groep dieren zal na 26 weken worden opgeofferd en een groep na 52 weken.



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

Implantaten zullen bilateraal worden geïmplantatoerd in de knie (twee implantaten per dier) om het benodigde aantal dieren tot een minimum te beperken.

Om het aantal benodigde proefdieren te bepalen is een berekening gedaan om de groepsgrootte te bepalen. De belangrijkste uitkomstmaat is de OCHAS score. Vergelijkbare studies leveren een indicatie voor de spreiding en de effectgrootte (Custers et al. 2010).

1. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar; 18(3): 377-88.

B. De dieren

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

Vrouwelijke geiten zullen worden gebruikt voor deze studie omdat deze vanwege de commerciële houderijsystemen veel makkelijker te verkrijgen zijn en omdat vrouwelijke geiten binnen één groep kunnen worden gehuisvest [1]. Het gebruik van alleen vrouwelijke dieren zal naar verwachting geen invloed hebben op de resultaten van de studie en de belasting van de knie (de belangrijkste factor van invloed op de uitkomstmaten). Het gebruik van alleen vrouwelijke dieren is een veelvuldig gemaakte- en breed geaccepteerde keuze in preklinische studies naar verschillende kraakbeenherstel technieken [2-5].

Er is gekozen voor een grote diersoort omdat er een implantaat wordt getest dat is ontworpen voor humaan gebruik; het implantaat moet passen in het te testen gewricht. Er is gekozen voor geiten omdat de anatomie van de geitenknie gelijkenis toont met de humane knie [6] en omdat de dikte van het kraakbeen het dichtst in de buurt komt bij die van de mens [6,7]. In studies waarbij andere osteochondrale implantaten (veelal resorbeerbare implantaten of metalen implantaten) worden getest, wordt ook veelvuldig gebruik gemaakt van de geit [6-8]. De dieren dienen skeletair volwassen te zijn (>1.5 jaar). De voorkeur gaat meteen ook uit naar geiten van 1.5-2 jaar oud, omdat geiten van nature slijtage van het kraakbeen vertonen en dat erger wordt met toenemende leeftijd.

Vier groepen bestaande uit elk 8 stuks (inclusief mogelijke uitval) zullen worden geïncubeerd in deze studie. De vier verschillende groepen bestaan uit: twee varianten van het kunststof implantaat, één groep met metalen implantaten en één groep sham geopereerde knieën. Er zijn twee tijdstippen van opoffering (8 stuks x 4 groepen x 2 tijdstippen=64 knieën). Omdat de implantaten bilateraal worden geïmplanteerd, zal het aantal 32 dieren bedragen (64 knieën / 2 knieën per dier = 32 dieren).

1. Fulton LK, Clarke MS, Farris HE, Farm Animals in Biomedical Research-Part Two: The Goat as a Model for Biomedical Research and Teaching ILAR J (1994) 36 (2): 21-29 doi:10.1093/ilar.36.2.21
2. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. Osteoarthritis Cartilage. 2010 Mar;18(3):377-88
3. Vrancken AC, Madej W, Hannink G, Verdonschot N, van Tienen TG, Buma P. Short Term Evaluation of an Anatomically Shaped Polycarbonate Urethane Total Meniscus Replacement in a Goat Model. PLoS One. 2015 Jul 20;10(7):e0133138.
4. Brehm W, Aklin B, Yamashita T, Rieser F, Trüb T, Jakob RP, Mainil-Varlet P. Repair of superficial osteochondral defects with an autologous scaffold-free cartilage construct in a caprine model: implantation method and short-term results. Osteoarthritis Cartilage. 2006 Dec;14(12):1214-26. Epub 2006 Jul 3.
5. Jackson DW, Lalor PA, Aberman HM, Simon TM. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A preliminary study. J Bone Joint Surg Am. 2001 Jan;83-A(1):53-64.
6. Kon E, Filardo G, Shani J, Altschuler N, Levy A, Zaslav K, Eisman JE, Robinson D. Osteochondral regeneration with a novel aragonite-hyaluronate biphasic scaffold: up to 12-month follow-up study in a goat model. J Orthop Surg Res. 2015 May 28;10:81. doi: 10.1186/s13018-015-0211-y.
7. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, Mainil-Varlet P, McIlwraith CW, Sah RL, Whiteside RA. Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. Cartilage. 2011 Apr;2(2):137-52.
8. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. Osteoarthritis Cartilage 2009;17: 705–13.
9. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. Tissue Eng Part B Rev 2010;16: 105–15.

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: Initiële fixatie zal vantevoren worden beoordeeld in (dierlijke) kadaverknieën. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van een universele gewrichten testmachine. Dit apparaat zal worden gebruikt om fysiologische belasting van de (kadaver) knie na te bootsen. Hierdoor zal de volledige korte termijn

stabilisatie van het implantaat in kaart kunnen worden gebracht voordat er dierenproeven worden uitgevoerd. De kans op vroege loslating, met falen van het experiment als gevolg, zal daardoor tot een minimum worden beperkt. Verder zal een grote variatie aan implantaat stukken met combinaties van verschillende coatings en poriematen worden gescreend op botceladhesie en osteoinductie in verschillende *in vitro* modellen. Op deze manier zal er een voorselectie met betrekking tot de soort coating en de porositeit van het implantaat worden gemaakt.

Vermindering: Implantaten zullen bilateraal operatief worden geplaatst. Dit zal leiden tot een halvering van het benodigde aantal dieren. Het bilateraal plaatsen van implantaten ter behandeling van kraakbeen defecten is eerder gedaan met soortgelijke osteochondrale implantaten [1,2] waardoor deze aanpak is gerechtvaardigd. Adequate anaesthesie en analgesie protocollen zullen worden samengesteld in overleg met een veterinaire anaesthesioloog om pijn zoveel mogelijk te verminderen. Het postoperatieve beleid is erop gericht om dieren zo snel mogelijk weer ambulante te krijgen, met minimale ervaring van stress. Combinaties van verschillende implantaten in de linker en rechter knieën zullen worden gevarieerd om potentiële bias te voorkomen.

Verfijning: Optimale, lege artis en protocollair uitgevoerde peri- en postoperatieve zorg middels anesthesie en analgesie zullen ervoor zorgen dat de dieren zo min mogelijk pijn ondervinden van de chirurgische interventie. Er is gekozen voor een grote diersoort in plaats van een lagere diersoort zoals een konijn omdat kleine diersoorten over een grotere intrinsieke reparatie capaciteit van kraakbeen beschikken en omdat de anatomie en mechanische belasting in de knie moeilijker te vergelijken is met de mens [3-5].

1. Custers RJ, Dhert WJ, Saris DB, Verbout AJ, van Rijen MH, Mastbergen SC, Lafeber FP, Creemers LB. Cartilage degeneration in the goat knee caused by treating localized cartilage defects with metal implants. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010 Mar;18(3):377-88.
2. Leng P, Wang YZ, Zhang HN. Repair of large osteochondral defects with mix-mosaicplasty in a goat model. *Orthopedics*. 2013 Mar;36(3):e331-6.
3. Hurtig MB, Buschmann MD, Fortier LA, Hoemann CD, Hunziker EB, Jurvelin JS, Mainil-Varlet P, McIlwraith CW, Sah RL, Whiteside RA. Preclinical Studies for Cartilage Repair: Recommendations from the International Cartilage Repair Society. *Cartilage*. 2011 Apr;2(2):137-52.
4. Ahern BJ, Parvizi J, Boston R, Schaer TP. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:705–13.
5. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:105–15.

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.

Dieren zullen buiten de postoperatieve fase in groepen worden gehuisvest uit sociaal oogpunt om zodoende angst en eenzaamheid tot een minimum te beperken. De dieren zullen protocollair worden voorbereid, geopereerd en postoperatief worden nabehandeld. Anaesthesie, peroperatieve pijnbestrijding, antibiotica en postoperatieve analgetica zullen daarbij lege artis worden toegepast.

Na de operatie worden de dieren niet door middel van een spalk of sling beperkt in mobiliteit. Dieren zullen de eerste weken na de operatie wel individueel (of samen met andere net geopereerde geiten) worden gehuisvest in een beperkte ruimte om geleidelijk aan beweging toe te laten. Tijdens deze periode zullen de bedding eventueel worden aangepast naar behoefte. Individueel gehuisveste dieren zullen in dezelfde ruimte en naast andere geiten verblijven (in direct contact) uit sociaal oogpunt. Dieren zullen direct worden terug geplaatst in de groep wanneer ze volledig ambulante zijn zonder claudicatie.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Het implantaat dat zal worden getest is een uniek en nieuw ontwikkeld implantaat, waarmee nog geen eerdere dierenproeven uitgevoerd zijn geweest.

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.

Individuele huisvesting (of huisvesting in paren) zal plaats vinden na de operatie zodat dieren voorzichtig weer gaan bewegen. De geiten zullen in dezelfde ruimte en naast andere geiten (in direct contact) verblijven uit sociaal oogpunt. Dieren zullen direct worden terug geplaatst in de groep wanneer ze volledig ambulantly zijn zonder claudicatie.

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

Peri- en postoperatief (minimaal drie dagen) zal pijnstilling worden toegediend. De dieren moeten volledig zelfstandig ambulantly zijn voordat de pijnstilling zal worden gestopt.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Loslating van het implantaat of afstoting door het lichaam kan optreden.

Postoperatieve wondinfectie blijft een risico na elke chirurgische ingreep.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Loslating van het implantaat kan optreden vanwege mechanisch falen, implantaatinfectie leidend tot osteomyelitis met botresorptie, danwel afstoting van het lichaam.

Mogelijke oorzaken van postoperatieve wondinfectie zijn: niet geheel steriel werken, niet voldoende steriel afdekken of onvoldoende prepareren van het chirurgische gebied.

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

Profylactische antibiotica zal pre- en postoperatief worden toegediend. Stricte maatregelen zullen worden genomen om de steriliteit tijdens de procedure te waarborgen. Eventueel zal de wond postoperatief worden afgedekt met een jodium film om blootstelling aan bacteriën na de operatie te voorkomen. Een ervaren orthopedische chirurg (knie-specialist) zal de operaties uitvoeren.

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.

Niet belasten van de poot of blijvende claudicatie ondanks analgesie zijn de meest voor de hand liggende complicaties. Dit kan leiden tot spieratrofie. Loslating van het implantaat (evt door afstoting) kan hier een oorzaak van zijn. Blijvende claudicatie wordt derhalve beschouwd als humaan eindpunt.

Postoperatieve wondinfectie, leidend tot volledige gewrichtsontsteking en algehele malaise die niet onder controle is te krijgen door middel van antibiotica toediening, wordt ook beschouwd als humaan eindpunt.

Langdurige postoperative zwakte, waarbij het dier niet zelfstandig kan staan.

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

Niet belasten van de poot of blijvende claudicatie wordt niet vaak beschreven in de literatuur bij vergelijkbare studies. Omdat dit een nieuw te ontwikkelen implantaat betreft, wordt voor de zekerheid een kans van 5% aangehouden.

Minder dan 1% van de patiënten loopt kans op een postoperatieve infectie na autologe kraakbeen transplantatie, een ingreep die vergelijkbaar is met deze proef qua invasiviteit en duur [1]. In één studie beschreven door Saw et al. [2], ontwikkelde 1 van de 15 geiten (6.7%) een postoperatieve infectie in de knie. In vele andere soortgelijke studies bij geiten worden echter geen infecties gemeld. Daaruit concluderen we dat kans op infecties bij geiten na kraakbeen operaties soortgelijk is als bij de mens. De kans op langdurige postoperatieve zwakte lijkt zeer beperkt. De kans op optreden van een van deze beide complicaties wordt op 5% geschat.

1. Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. 2011 Jul;19(7):779-91.
2. Saw KY, Hussin P, Loke SC, Azam M, Chen HC, Tay YG, Low S, Wallin KL, Ragavanaidu K. Articular cartilage regeneration with autologous marrow aspirate and hyaluronic Acid: an experimental study in a goat model. *Arthroscopy*. 2009 Dec;25(12):1391-400.

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.

De dieren zullen eenmalig een operatieve ingreep ondergaan, waarvoor ze onder algehele anaesthesie worden gebracht. Het onder anaesthesie brengen en ontwaken hieruit kan tot enige vorm van stress leiden. De operatieve ingreep kan leiden tot moeilijke ambulatie, hetgeen stress en pijn kan veroorzaken. Om vroege loslating te voorkomen zullen de dieren de eerste dagen na de operatie individueel of in paren worden gehuisvest. Gedurende deze periode zullen herstellende dieren wel in direct contact blijven met andere geiten en zullen de dieren direct worden terug geplaatst in de groep zodra ze volledig ambulant zijn zonder claudicatie.

Uiteindelijk classificeren we het totaal ongerief als matig, vanwege de mogelijke pijn en stress.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De belangrijkste uitkomstmaat is de conditie van het aanliggende en overstaande kraakbeen rondom het implantaat. Hiervoor is histopathologisch onderzoek noodzakelijk via OCHAS, de conditie van het kraakbeen kan macroscopisch moeilijk worden vergeleken. Hiervoor zal het dier moeten worden geëuthanaseerd.

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

DEC-advies PV-2015-018- [REDACTED]

dd. 07-04-2016

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer; 2015-018

Titel van het project; *De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie.*

2. Titel van de NTS; *De ontwikkeling van een kunststof implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie.*

3. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer

4. Contactgegevens DEC:

- naam DEC; DEC-UM
- telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
[REDACTED]
- mailadres contactpersoon;
[REDACTED]

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

- ontvangen door DEC; 08-03-2016
- aanvraag compleet
- in vergadering besproken; 18-03-2016
- anderszins behandeld
- termijnonderbreking van 24-03 tot 31-03-2016 en van 05-04-2016 tot
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
- aanpassing aanvraag
- advies aan CCD

6. Eventueel horen van aanvrager **NVT**

7. Correspondentie met de aanvrager

- **Datum 24-03-2016**

- **Strekking van de vragen:**

- De DEC-UM wenst een wetenschappelijke onderbouwing voor het gebruik van vrouwen.
- De voorkeur gaat kennelijk uit naar vrouwelijke dieren. Evenals bij andere herkauwers hebben vrouwelijke geiten een calciumstofwisseling, die rond de partus balanceert op het scherpst van de snede. Is dit van belang bij de selectie/inclusie van dieren in relatie tot de geringe omvang van de groepsgroottes van acht dieren?

- **Datum antwoord 31-03-2016**

- **Strekking van de antwoorden:**

- De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages.

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

NTS is dd. 05-04-2016 retour gestuurd naar onderzoeker met commentaar.

Retour ontvangen dd. 06-04-2016

8. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **NVT**

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; **NVT**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is: **X** uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
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. NVT
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**.
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. Ja, dit wordt ondermeer geïllustreerd door het injecteren van fluorochrome labels op twee verschillende tijdstippen, waardoor herhaald kan worden gemeten aan hetzelfde dier.
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. **Ja**, door toepassing van de universele gewrichtentestmachine kan de volledige korte termijn stabilisatie van het implantaat in kaart worden gebracht voordat er dierproeven worden uitgevoerd, waardoor de kans op vroege loslating, met toename van het ongerief en falen van het experiment als gevolg tot een minimum wordt beperkt.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd

D. Ethische afweging

De DEC-UM heeft het projectvoorstel “*De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie*” bestudeerd. Het doel is het ontwikkelen en preklinisch testen van een kunststof implantaat, dat voldoende gefixeerd blijft en effectief is, en waarvan de biomechanische eigenschappen overeenkomen met die van kraakbeen. Het project behelst experimenten gedurende 5 jaar, met in totaal 52 geiten, die matig ongerief zullen ondervinden en na de experimenten worden opgeofferd. Anderzijds onderschrijft de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier.

De DEC-UM is overtuigd van de wetenschappelijke kwaliteit en het maatschappelijke belang van het voorgestelde onderzoeksproject. De opzet van het onderzoeksproject is helder, logisch en navolgbaar. De doelstellingen van de diverse onderdelen en de stapsgewijze aanpak, te beginnen met kadaverknieën, *in vitro* modellen en uiteindelijk met levende dieren, zijn overtuigend. De aanvrager beschikt over de benodigde wetenschappelijke kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie.

De gewenste uitkomsten lijken relevant en haalbaar.

Kraakbeenletsel aan de knie is een veel voorkomende aandoening bij mensen van middelbare leeftijd en ouder. Dit kan leiden tot artrose, pijn en invaliditeit en uiteindelijk de noodzakelijke vervanging van het kniegewricht door een knieprothese, die ook slechts een beperkte levensduur heeft. Voor deze, door de vergrijzing groeiende, categorie patiënten zou een betere behandeling dan de huidige met metalen implantaten en uitstel van de noodzaak van een knieprothese, wenselijk zijn.

Resultaten van dit onderzoek zijn derhalve belangrijk voor grote aantallen 40-plussers en hun naasten. De DEC-UM acht derhalve de doelstelling van dit onderzoek van substantieel belang.

In de gekozen strategie, technieken en diermodel wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. Onderzoekers kiezen op pragmatische gronden voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren. Zij gaan ervan uit dat het gebruik van één sexe geen invloed heeft op de resultaten. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder geiten zou kunnen worden uitgevoerd, dan wel het gebruik van levende dieren zou kunnen worden vermeden.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM in haar ethische afweging het belang van project 2015-018 *“De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie”* van zwaarder gewicht dan de voorziene schade, matig ongerief en dood, voor de maximaal 52 betrokken dieren.

De DEC-UM beschouwt de voorgestelde dierproeven derhalve als ethisch gerechtvaardigd en voorziet het projectvoorstel *“De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie”* van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-UM tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar is.

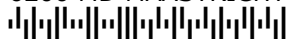


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002016514

Bijlagen

2

Datum 11 april 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 april 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002016514. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

Als wij nog informatie van u nodig hebben dan ontvangt u daarover bericht. Uw aanvraag is in ieder geval niet compleet als de leges niet zijn bijgeschreven op de rekening van de CCD. U ontvangt binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. Als wij nog informatie van u nodig hebben, wordt deze termijn opgeschort. In geval van een complexe aanvraag kan deze termijn met maximaal vijftien werkdagen verlengd worden. U krijgt bericht als de beslisperiode van uw aanvraag vanwege complexiteit wordt verlengd. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Factuur

Bijgaand treft u de factuur aan voor de betaling van de leges. Wij verzoeken u de leges zo spoedig mogelijk te voldoen, zodat we uw aanvraag in behandeling kunnen nemen. Is uw betaling niet binnen dertig dagen ontvangen, dan kan uw aanvraag buiten behandeling worden gesteld. Dit betekent dat uw aanvraag niet beoordeeld wordt en u uw project niet mag starten.

Meer informatie

Heeft u vragen, kijk dan op www.centralecommissiedierproeven.nl. 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]

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 2016
Geplande einddatum: 30 juni 2021
Titel project: De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie
Titel niet-technische samenvatting: De ontwikkeling van een kunststof implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616, 6200 MD Maastricht
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
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:

Maastricht

Datum:

7 april 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht



Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD107002016514

Bijlagen

2

Datum 11 april 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 11 april 2016

Vervaldatum: 11 mei 2016

Factuurnummer: 16700514

| Omschrijving | Bedrag |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002016514 | € 1.187,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
[Redacted]
Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT
[Barcode]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD107002016514
Bijlagen
1

09 JUN 2016

Datum
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 11 april 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie" met aanvraagnummer AVD107002016514. 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). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juli 2016 tot en met 30 juni 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 april 2016. 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. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aanvullend worden algemene voorwaarden gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

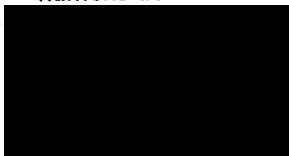
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



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: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 juli 2016 tot en met 30 juni 2021, voor het project "De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie" met aanvraagnummer AVD107002016514, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Stafid orthopedie, orthopedisch chirurg.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 april 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2016;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 11 april 2016;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 april 2016, ontvangen op 11 april 2016.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---|---|---------------|-------|---|
| 1: Geitenstudie: Het effect van oppervlaktestructuur en coating op de osteointegratie van een kunststof implantaat ter behandeling van kraakbeendefecten in de knie | Geiten (<i>Capra aegagrus hircus</i>) / melkgeiten, commercieel verkregen | 20 | Matig | De dieren worden anders dan in Bijlage III van de richtlijn gehuisvest en verzorgd: Individuele huisvesting (of huisvesting in paren) zal plaats vinden na de operatie zodat dieren voorzichtig weer gaan bewegen. De geiten zullen in dezelfde ruimte en naast andere geiten (in direct contact) verblijven uit sociaal oogpunt. Dieren zullen direct worden terug geplaatst in de groep wanneer ze volledig ambuland zijn zonder claudicatie. |

| | | | | |
|---|---|----|-------|---|
| 2: Geitenstudie: Het effect van een kunststof implantaat ter behandeling van kraakbeendefecten op de gezondheid van aan- en tegenoverliggende kraakbeen op lange termijn in de knie | Geiten (<i>Capra aegagrus hircus</i>) / melkgeiten, commercieel verkregen | 32 | Matig | De dieren worden anders dan in Bijlage III van de Richtlijn gehuisvest en verzorgd: Individuele huisvesting (of huisvesting in paren) zal plaats vinden na de operatie zodat dieren voorzichtig weer gaan bewegen. De geiten zullen in dezelfde ruimte en naast andere geiten (in direct contact) verblijven uit sociaal oogpunt. Dieren zullen direct worden terug geplaatst in de groep wanneer ze volledig ambuland zijn zonder claudicatie. |
|---|---|----|-------|---|

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, 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 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 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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

DEC-advies PV-2015-018- [REDACTED]

dd. 07-04-2016

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer; 2015-018

Titel van het project; *De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie.*

2. Titel van de NTS; *De ontwikkeling van een kunststof implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie.*

3. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer

4. Contactgegevens DEC:

- naam DEC; DEC-UM
- telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
[REDACTED]
- mailadres contactpersoon;
[REDACTED]

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

- ontvangen door DEC; 08-03-2016
- aanvraag compleet
- in vergadering besproken; 18-03-2016
- anderszins behandeld
- termijnonderbreking van 24-03 tot 31-03-2016 en van 05-04-2016 tot
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
- aanpassing aanvraag
- advies aan CCD

6. Eventueel horen van aanvrager **NVT**

7. Correspondentie met de aanvrager

- **Datum 24-03-2016**
- **Strekking van de vragen:**
- De DEC-UM wenst een wetenschappelijke onderbouwing voor het gebruik van vrouwen.
- De voorkeur gaat kennelijk uit naar vrouwelijke dieren. Evenals bij andere herkauwers hebben vrouwelijke geiten een calciumstofwisseling, die rond de partus balanceert op het scherpst van de snede. Is dit van belang bij de selectie/inclusie van dieren in relatie tot de geringe omvang van de groeps groottes van acht dieren?

- **Datum antwoord 31-03-2016**
- **Strekking van de antwoorden:**
- De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages.

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

NTS is dd. 05-04-2016 retour gestuurd naar onderzoeker met commentaar.
Retour ontvangen dd. 06-04-2016

8. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **NVT**

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; **NVT**

C. Beoordeling (inhoud):

1. Het project is: **X** uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.
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. NVT
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**.
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. Ja, dit wordt ondermeer geïllustreerd door het injecteren van fluorochrome labels op twee verschillende tijdstippen, waardoor herhaald kan worden gemeten aan hetzelfde dier.
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. **Ja**, door toepassing van de universele gewrichtentestmachine kan de volledige korte termijn stabilisatie van het implantaat in kaart worden gebracht voordat er dierproeven worden uitgevoerd, waardoor de kans op vroege loslating, met toename van het ongerief en falen van het experiment als gevolg tot een minimum wordt beperkt.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd

D. Ethische afweging

De DEC-UM heeft het projectvoorstel "*De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie*" bestudeerd. Het doel is het ontwikkelen en preklinisch testen van een kunststof implantaat, dat voldoende gefixeerd blijft en effectief is, en waarvan de biomechanische eigenschappen overeenkomen met die van kraakbeen. Het project behelst experimenten gedurende 5 jaar, met in totaal 52 geiten, die matig ongerief zullen ondervinden en na de experimenten worden opgeofferd. Anderzijds onderschrijft de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier.

De DEC-UM is overtuigd van de wetenschappelijke kwaliteit en het maatschappelijke belang van het voorgestelde onderzoeksproject. De opzet van het onderzoeksproject is helder, logisch en navolgbaar. De doelstellingen van de diverse onderdelen en de stapsgewijze aanpak, te beginnen met kadaverknieën, *in vitro* modellen en uiteindelijk met levende dieren, zijn overtuigend. De aanvrager beschikt over de benodigde wetenschappelijke kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie. De gewenste uitkomsten lijken relevant en haalbaar.

Kraakbeenletsel aan de knie is een veel voorkomende aandoening bij mensen van middelbare leeftijd en ouder. Dit kan leiden tot artrose, pijn en invaliditeit en uiteindelijk de noodzakelijke vervanging van het kniegewricht door een knieprothese, die ook slechts een beperkte levensduur heeft. Voor deze, door de vergrijzing groeiende, categorie patiënten zou een betere behandeling dan de huidige met metalen implantaten en uitstel van de noodzaak van een knieprothese, wenselijk zijn. Resultaten van dit onderzoek zijn derhalve belangrijk voor grote aantallen 40-plussers en hun naasten. De DEC-UM acht derhalve de doelstelling van dit onderzoek van substantieel belang.

In de gekozen strategie, technieken en diermodel wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning. Onderzoekers kiezen op pragmatische gronden voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren. Zij gaan ervan uit dat het gebruik van één sexe geen invloed heeft op de resultaten. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder geiten zou kunnen worden uitgevoerd, dan wel het gebruik van levende dieren zou kunnen worden vermeden.

Op grond van deze argumenten acht de DEC-UM in haar ethische afweging het belang van project 2015-018 *“De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie”* van zwaarder gewicht dan de voorziene schade, matig ongerief en dood, voor de maximaal 52 betrokken dieren.

De DEC-UM beschouwt de voorgestelde dierproeven derhalve als ethisch gerechtvaardigd en voorziet het projectvoorstel *“De ontwikkeling van een niet-resorbeerbaar, kunststof osteochondraal implantaat voor de behandeling van kraakbeendefecten in de knie”* van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-UM tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar is.